

**Aus dem Institut für Pathologie
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. R. Moll**

**Differentielle Expression von Claudinen entlang des
menschlichen Nephrons und in epithelialen
Nierenzelltumoren**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

Dem Fachbereich Medizin der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt
von

Inken Kemmer
aus Hamm

Marburg 2005

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

am 01.12.05. Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. B. Maisch

Referent: Prof. Dr. R. Moll

Coreferent: Prof. Dr. G. Aumüller

Differentielle Expression von Claudinen entlang des menschlichen Nephrons und in epithelialen Nierenzelltumoren

I	Inhaltsverzeichnis	I
II	Abbildungsverzeichnis	IV
III	Tabellenverzeichnis	VI
IV	Abkürzungsverzeichnis	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Epitheliale Zellen der Niere und epitheliale Nierenzelltumoren	1
1.1.1	Normale Epithelzellen des Nephrons	1
1.1.2	Epitheliale Nierenzelltumoren	2
1.1.3	Das Nierenzellkarzinom vom klarzelligen Typ	5
1.1.4	Das Nierenzellkarzinom vom papillären (chromophilen) Typ	6
1.1.5	Das Nierenzellkarzinom vom chromophoben Typ	7
1.2	Tight junctions	8
1.2.1	Allgemeines	8
1.2.2	Morphologie	9
1.2.3	Proteine der Tight junction	10
1.2.4	Funktionen der Tight junction	13
1.2.5	TJ in der Niere	15
1.3	Ziele der Arbeit	15
2	Material und Methoden	17
2.1	Geräte	17
2.2	Enzyme und Chemikalien	17
2.3	Biologisches Material	18

2.4 Puffer und Lösungen	18
2.5 Die Immunhistochemie	19
2.5.1 Vorbereitung der Gewebe	19
2.5.2 Antikörperreaktionen	20
2.5.3 Nachbereitung der Gewebe und Dokumentation	21
2.6 Statistische Methoden	22
3 Ergebnisse	27
3.1 Immunhistochemische Befunde im normalen Nierengewebe	28
3.1.1 Occludin	29
3.1.2 ZO-1	31
3.1.3 Claudin 1	32
3.1.4 Claudin 2	35
3.1.5 Claudin 3	36
3.1.6 Claudin 4	40
3.1.7 Claudin 8	43
3.1.8 Claudin 11	43
3.1.9 Zusammenfassung	48
3.2 Immunhistochemische Befunde im klarzelligen Nierenzellkarzinom	49
3.2.1 Occludin	49
3.2.2 ZO-1	49
3.2.3 Claudin 1	49
3.2.4 Claudin 2	50
3.2.5 Claudin 3	50
3.2.6 Claudin 4	51
3.2.7 Claudin 8	51
3.2.8 Claudin 11	51
3.2.9 Vergleich zum normalen Nephron	51
3.3 Immunhistochemische Befunde im papillären Nierenzellkarzinom	54
3.3.1 Occludin	54
3.3.2 ZO-1	54
3.3.3 Claudin 1	55
3.3.4 Claudin 2	55
3.3.5 Claudin 3	55
3.3.6 Claudin 4	56
3.3.7 Claudin 8	56
3.3.8 Claudin 11	56
3.3.9 Vergleich zum normalen Nephron	59

3.4 Immunhistochemische Befunde im chromophoben Nierenzellkarzinom	59
3.4.1 Occludin	59
3.4.2 ZO-1	59
3.4.3 Claudin 1	60
3.4.4 Claudin 2	60
3.4.5 Claudin 3	60
3.4.6 Claudin 4	60
3.4.7 Claudin 8	61
3.4.8 Claudin 11	61
3.4.9 Vergleich zum normalen Nephron	61
3.5 Zusammenfassung	64
3.6 Statistische Analysen	65
3.6.1 p-Werte der Tumorentitäten	65
3.6.2 Adjustierung der p-Werte mit der Holm-Prozedur	68
4 Diskussion	69
4.1 Normales Nierengewebe	70
4.2 Nierenzellkarzinome	79
4.3 Ausblick	86
5 Zusammenfassung	89
V Literaturverzeichnis	X
VI Anhang	XXI

II Abbildungsverzeichnis

	Seite
Abb. 3.1: Immunhistochemische Analysen von Occludin im distalen Normalnierengewebe (Markstrahl) im Vergleich mit THP und CK 19.	30
Abb. 3.2: Immunhistochemische Analysen von ZO-1 im distalen Normalnierengewebe (Nierenmark) verglichen mit THP und CK 19.	33
Abb. 3.3: Immunhistochemische Analysen von Claudin 1 in Gegenüberstellung zu Villin, THP und CK 19 am Normalnierengewebe (Rinde).	34
Abb. 3.4: Immunhistochemische Analysen von Claudin 2 in Gegenüberstellung zu Villin, THP und CK 19 am Normalnierengewebe (Rinde).	36
Abb. 3.5: Immunhistochemische Analysen von Claudin 3 im Vergleich zu Villin, THP und CK 19 im Normalnierengewebe (Rinde).	38
Abb. 3.6: Immunhistochemische Analysen von Claudin 3 im distalen Normalnierengewebe (Mark) im Vergleich zu THP und CK 19.	39
Abb. 3.7: Immunhistochemische Analysen von Claudin 4 im Vergleich zu Villin, THP und CK 19 im Normalnierengewebe (Rinde).	41
Abb. 3.8: Immunhistochemische Analysen von Claudin 4 im distalen Normalnierengewebe (Mark) verglichen mit THP und CK 19.	42
Abb. 3.9: Immunhistochemische Analysen von Claudin 8 am Normalnierengewebe (Rinde) verglichen mit Villin, THP und CK 19.	44
Abb. 3.10: Immunhistochemische Analysen von Claudin 8 im distalen Normalnierengewebe (Mark) verglichen mit THP und CK 19.	45
Abb. 3.11: Immunhistochemische Analysen von Claudin 11 am Normalnierengewebe (Rinde) im Vergleich mit Villin, THP und CK 19.	46

Abb. 3.12: Immunhistochemische Analysen mit Claudin 11 im distalen Normalnierengewebe (Mark) im Vergleich mit THP und CK 19.	47
Abb. 3.13: Schematische Darstellung der Antikörperreaktionen entlang des Tubulussystems im Normalnierengewebe.	48
Abb. 3.14: Immunhistochemische Analysen von Occludin, ZO-1, Claudin 1, Claudin 2 und Claudin 3 am klarzelligen Nierenzellkarzinom.	52
Abb. 3.15: Immunhistochemische Analysen von Claudin 4, Claudin 8 und Claudin 11 am klarzelligen Nierenzellkarzinom.	53
Abb. 3.16: Immunhistochemische Analysen von Occludin, ZO-1, Claudin 1, Claudin 2 und Claudin 3 am papillären Nierenzellkarzinom.	57
Abb. 3.17: Immunhistochemische Analysen von Claudin 4, Claudin 8 und Claudin 11 am papillären Nierenzellkarzinom.	58
Abb. 3.18: Immunhistochemische Analysen von Occludin, ZO-1, Claudin 1, Claudin 2, Claudin 3 und Claudin 4 am chromophoben Nierenzellkarzinom.	62
Abb. 3.19: Immunhistochemische Analysen von Claudin 4, Claudin 8 und Claudin 11 am chromophoben Nierenzellkarzinom.	63

III Tabellenverzeichnis

	Seite
Tab. 1.1 : Klassifikationsschema epithelialer Nierentumoren (nach Störkel, 1999)	3
Tab. 1.2 : Inzidenz epithelialer Nierentumoren (nach Störkel, 1999)	3
Tab. 2.1: Primärantikörper und Gewebepvorbereitung	21
Tab. 2.2: Beispiel für eine Kontingenztafel	23
Tab. 2.3: 2. Beispiel für eine Kontingenztafel	24
Tab. 2.4: 3. Beispiel für eine Kontingenztafel	24
Tab. 3.1: Klassifizierung immunhistochemischer Befunde	28
Tab. 3.2: Expression von Occludin	31
Tab. 3.3: Expression von ZO-1	32
Tab. 3.4: Expression von Claudin 1	35
Tab. 3.5: Expression von Claudin 2	35
Tab. 3.6: Expression von Claudin 3	37
Tab. 3.7: Expression von Claudin 4	40
Tab. 3.8: Expression von Claudin 8	43
Tab. 3.9: Expression von Claudin 11	46
Tab. 3.10: Übersicht der Expression in Tumoren	64
Tab. 3.11: Kontingenztafel Claudin 2 Klarzellig versus Papillär	65
Tab. 3.12: Kontingenztafel Claudin 2 Klarzellig versus Chromophob	66
Tab. 3.13: Kontingenztafel Claudin 2 Papillär versus Chromophob	66
Tab. 3.14: Kontingenztafel Claudin 3 Klarzellig versus Papillär	66

Tab. 3.15:	Kontingenztafel Claudin 3 Klarzellig versus Chromo- phob	66
Tab. 3.16:	Kontingenztafel Claudin 3 Papillär versus Chromo- phob	66
Tab. 3.17:	Kontingenztafel Claudin 4 Klarzellig versus Papillär	67
Tab. 3.18:	Kontingenztafel Claudin 4 Klarzellig versus Chromo- phob	67
Tab. 3.19:	Kontingenztafel Claudin 4 Papillär versus Chromo- phob	67

IV Abkürzungsverzeichnis

ADH	Antidiuretisches Hormon
AJ	Adherens junction
CAC	Carboanhydrase C
CD	Cluster of Differentiation (hämatopoetischer Antikörpercode)
cDNA	Komplementäre DNA
CK 19	Cytokeratin 19
CPE	Clostridium-Perfringens-Enterotoxin
DBA	Dolichus-biflorus-Agglutinin
EM	Elektronenmikroskopie
EMA	Epitheliales Membran-Antigen
GGT	Gamma-Glutamyltransferase
GUK	Guanyl kinase-like
HE	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
JAM	Junction adhesion molecule
MB2	Antikörper-Codebezeichnung (kommerziell)
MDCK	Madin-Darby canine kidney
OSP	Oligodendrozyten-spezifisches Protein
PDZ	Proteinbindende Domäne (zuerst in den Proteinen P SD-95, D LG und Z O-1 beschrieben)
PBS	Phosphat buffered saline (Puffer)
SH3	Src homology region 3
TBS	Tris buffered saline (Puffer)
THP	Tamm Horsfall Protein
TJ	Tight junction
TMVCF	transmembrane protein deleted in VCFS (siehe unten)
TN	Antikörper-Codebezeichnung
TER	Transepithelial electric resistance (transepithelialer Widerstand)
UEA	Ulex-europaeus-Agglutinin
UICC	Union Internationale Contre le Cancer

VCFS	Velo-cardial-facial syndrome
VHL	Von-Hippel-Lindau
ZNS	Zentrales Nervensystem
ZO-1	Zonula occludens-1 (ebenso ZO-2 und ZO-3)

1 Einleitung

1.1 Epitheliale Zellen der Niere und epitheliale Nierenzelltumoren

1.1.1 Normale Epithelzellen des Nephrons

Die Niere ist ein strukturell und funktionell hochkomplexes, aus zahlreichen Nephronen aufgebautes Organ. Jedes Nephron wird von einem einschichtigen Epithel ausgekleidet und gliedert sich in eine Reihe von Segmenten, die sich sowohl in der histologischen Struktur als auch in ihrer Funktion unterscheiden. Die verschiedenen Nephronsegmente sind für die Konzentrierung des Primärharns verantwortlich. Darüber hinaus sorgen feinabgestimmte regulatorische Mechanismen entlang der verschiedenen Nephronabschnitte für die gezielte Exkretion von auszuscheidenden Substanzen und ebenso für die Resorption von für den Organismus zu erhaltenden Substanzen. Diese unterschiedlichen Funktionen reflektieren sich auch in den strukturellen Eigenheiten der Epithelzellen der einzelnen Nephronsegmente, wie in ausgedehnten elektronenmikroskopischen Studien untersucht worden ist (FARQUHAR ET AL. 1963, SCHNEEBERGER ET AL. 1992). Mittels immunhistochemischer Färbungen gelingt es darüber hinaus, den Epithelien der verschiedenen Nephronabschnitte unterschiedliche und spezifische Markerprofile zuzuordnen. So wird z.B. Villin, ein bürstensaumassoziiertes Protein, spezifisch in den Epithelzellen des proximalen Tubulus exprimiert (STÖRKEL 1993), während das "Tamm-Horsfall-Glykoprotein" ein Marker für den dicken aufsteigenden Ast der Henle'schen Schleife und den gewundenen Teil des distalen Tubulus (STÖRKEL 1993; KIUCHI-SAISHIN 2002) darstellt. In analoger Weise lassen sich die Epithelzellen der einzelnen Nephronsegmente auch durch ihre differentielle Expression von Cytokeratin-Proteinen unterscheiden: Während

die primären zylinderepithelialen Cytokeratine, CK8 und CK18, entlang des gesamten Nephrons exprimiert werden, finden sich die sekundären zylinderepithelialen Cytokeratine CK19 und CK7 vorwiegend in den dünnen Schenkeln der Henle'schen Schleife und im Sammelrohr (MOLL ET AL. 1991; STÖRKEL 1993).

1.1.2 Epitheliale Nierenzelltumoren

In Analogie zu den vielfältigen normalen Epithelzelltypen der Niere lassen sich auch bei den epithelialen Tumoren der Niere eine Reihe spezifischer Entitäten unterscheiden, die sowohl durch spezifische morphologische Eigenschaften als auch typische immunhistologische Markerprofile gekennzeichnet sind. THOENES ET AL. (1986) haben die Nierenzelltumoren strikt nach morphologischen (zytologischen und histologischen) Kriterien in fünf Subtypen eingeteilt (klarzellige, chromophile, chromophobe, onkozytäre und Sammelgangtumoren). Darauf aufbauend konnten neuere zytogenetische Untersuchungen aufzeigen, dass sich diese morphologisch definierten Tumortypen spezifischen genotypischen Alterationen zuordnen lassen. Aus der Integration der morphologischen Eigenschaften, der immunhistochemischen Markerprofile und der zytogenetischen Befunde wurde 1997 in Zusammenarbeit mit der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) eine einheitliche Klassifikation vorgelegt, die die aktuelle Basis für die pathologische Klassifikation der epithelialen Nierentumoren darstellt. Die ein Jahr später erschienene WHO-Klassifikation (WHO, 1998) ist hingegen in einigen Punkten sehr problematisch und nicht auf die tatsächliche Biologie der verschiedenen Tumorentitäten abgestimmt – insbesondere bezüglich des nicht akzeptablen Begriffs des granularzelligen Karzinoms –, so dass in Deutschland ebenso wie in der vorliegenden Arbeit auf die UICC-Klassifikation von 1997 Bezug genommen wird. Die einzelnen Typen der gutartigen (Nierenzelladenome) und bösartigen (Nierenzellkarzinome) epithelialen Nierentumoren nach der neuen UICC-Klassifikation ist in Tabelle 1.1 dargestellt; ihre Häufigkeit ist aus Tabelle 1.2 ersichtlich.

Tabelle 1.1: Klassifikationsschema epithelialer Nierentumoren (nach Störkel, 1999)

WHO (1981)	Neue Klassifikation (UICC)
Nierenzelladenom (NZA)	NZA, Metanephrogener Typ NZA, Papillärer Typ (chromophil) NZA, Onkozytärer Typ
Nierenzellkarzinom (NZK)	NZK, Klarzelliger Typ NZK, Papillärer Typ (chromophil) NZK, Chromophober Typ NZK, Sammelgang-Typ NZK, Neuroendokriner Typ NZK, unklassifiziert

Tabelle 1.2: Inzidenz epithelialer Nierentumoren (nach Störkel, 1999)

Tumortyp	ICD-O	Häufigkeit
Klarzelliges NZK	8312/3	73%
Papilläres NZK	8320/3	12%
Onkozytäres Adenom	8290/0	5%
Chromophobes NZK	8310/3	5%
Sammelgang-Karzinom	8319/3	< 1%
Neuroendokrine Tumoren (Karzinoid, kleinzelliges NZK, PNET)	8240/3, 8041/3, 9473/3	< 1%
Unklassifizierte NZK	8312/3	< 1%
NZK, Nierenzellkarzinom; PNET, primitiver neuroektodermaler Tumor		

Während sowohl zur normalen Niere als auch zu den Nierenzelltumoren umfangreiche Daten bezüglich Morphologie, Immunhistochemie und Molekularbiologie vorliegen, liegen zu den Entstehungsmechanismen der Tumoren auf zellulärer Ebene noch unzureichende Informationen vor. Dieses mangelnde Wissen über die Histogenese der Nierenzelltumoren beruht z.T. auf der Tatsache, dass die Niere ein in der Tiefe gelegenes inneres Organ ist, bei dem morphologische Untersuchungen früher Tumorstadien nicht systematisch durchgeführt werden können. Dies ist anders als bei der Inspektion leicht zugänglicher Organe wie zum Beispiel der Haut oder des Dickdarmes per Endoskopie. So wird zum Beispiel für den häufigsten Typ des Nierenzellkarzinoms, das klarzellige Karzinom, eine adenomatöse Vorstufe bislang erst postuliert (STÖRKELE 1999). Die heutigen

Vorstellungen zur Histogenese beruhen überwiegend auf indirekten Daten, insbesondere auf Vergleichen der immunhistochemischen Profile zwischen den normalen Epithelzellen der einzelnen Nephronsegmente und den jeweiligen Tumoren. So ist bei dem klarzelligen Nierenzellkarzinom die gängige Auffassung, dass sich dieses vom proximalen Tubulusepithel ableitet. Für diese Annahme sprechen eine Reihe gemeinsamer immunhistochemischer Marker wie z.B. Villin, TN 3 und TN 7, welche sich sowohl im normalen proximalen Tubulus als auch im klarzelligen Nierenzellkarzinom finden (STÖRKEL 1993). Allerdings ist diese Auffassung nicht unumstritten. So vermuten Bannasch und Mitarbeiter, dass sich die klarzelligen Nierenzellkarzinome in Wirklichkeit vom Sammelrohr ableiten (CAO ET AL. 2000). Bei den papillären Nierenzellkarzinomen wird ebenfalls die Herkunft vom proximalen Tubulus angenommen. Hierfür spricht wiederum das Vorkommen der Marker Villin, TN 3 und TN 7, die sowohl in den Zellen des proximalen Tubulus als auch in den papillären Nierenzellkarzinomen zu finden sind (STÖRKEL 1993). Dagegen scheint sich das chromophobe Nierenzellkarzinom vom Sammelrohr, hier speziell von den Schaltzellen des Sammelrohrs, abzuleiten. Diese Annahme beruht in erster Linie auf der gemeinsamen Expression des Markerenzym Carboanhydrase C (STÖRKEL 1993). Ein direkter Beweis für die jeweils postulierten Histogenesewege der Nierenzellkarzinome konnte jedoch bislang noch nicht erbracht werden.

Die hier untersuchten Nierenzellkarzinome sind bösartige epitheliale Neubildungen. Bei einer Neuerkrankungsrate von ca. 8000 im Jahr sind die Nierenzellkarzinome die am häufigsten operierten Tumoren der Niere. An der Gesamtheit aller malignen Tumorerkrankungen sind die Nierenzellkarzinome mit einer Häufigkeit von 3% beteiligt. Die Inzidenz steigt ab dem 35. Lebensjahr an und erreicht ihren Höhepunkt in der sechsten Lebensdekade. Nierenzellkarzinome kommen überwiegend sporadisch vor, allerdings treten sie auch in hereditären Formen, wie zum Beispiel dem von Hippel-Lindau-Syndrom, auf (THOENES ET AL. 1986; STÖRKEL ET AL. 1993, 1995, 1997, 1999).

Die vorliegende Arbeit konzentriert sich auf die drei wichtigsten Vertreter der Nierenzellkarzinome, das klarzellige, das papilläre und das chromophobe Nierenzellkarzinom, die mit ihrer makroskopischen und mikroskopischen Morphologie im folgenden näher beschrieben werden sollen. Allen Typen ist gemeinsam, dass sich verschiedene Differenzierungsgrade (gut differenziert = G1, mäßig differenziert = G2, schlecht differenziert = G3) unterscheiden lassen, die mit der biologischen Aggressivität und der Prognose der Tumoren korreliert sind. Zu den typischen Zeichen der Progression des Nierenzellkarzinoms gehört der Tumoreinbruch in Venen, wobei Tumorzapfen über die Vena renalis weit in die Vena cava inferior einwachsen können. Die Prognose der Nierenzellkarzinome ist vergleichsweise schlecht, vor allem, weil es bei fortgeschrittenen Stadien noch keine befriedigende Therapie gibt. In der Literatur werden 5-Jahres-Überlebenszeiten von insgesamt 20-25% angegeben, abhängig von der lokalen Ausdehnung des Primärtumors, dem Einbruch in venöse Gefäße und dem Vorkommen von Lymphknotenmetastasen (SÖKELAND ET AL. 2001).

In den folgenden Abschnitten wird die Pathologie der drei wichtigsten Formen des Nierenzellkarzinoms kurz dargestellt (THOENES ET AL. 1986, STÖRKEL S 1993).

1.1.3 Das Nierenzellkarzinom vom klarzelligen Typ

Mit einer Häufigkeit von 73% ist diese Tumorart unter den Nierenzellkarzinomen die vorherrschende Form.

Makroskopie

Die kleineren Tumoren mit einer Größe von unter 3 cm zeichnen sich durch ihre runde Gestalt und ihre primär intrakortikale Lokalisation aus, wobei diese Tumoren ab einer Größe von etwa 3 cm häufig knotig und lobuliert sind. Sie haben eine unregelmäßige Oberfläche, die sich oft über

die Oberfläche des Nierengewebes hinaus erhebt. Die Tumoren werden von einer grau-weißen Pseudokapsel aus komprimiertem Nierengewebe und kollagenen Faseranteilen umgeben. Wegen des hohen Fett- und Glykogengehaltes zeigt der Tumor eine gelbe Schnittfläche, insbesondere in den gut differenzierten Arealen. Wenn der Tumor dedifferenziert oder sklerosiert, zeigt sich eine grau-weiße Schnittfläche.

Die meisten der klarzelligen Tumoren sind solide gebaut und zeigen vereinzelt zystische Regressionen. Nur sehr selten finden sich primär zystische klarzellige Nierenzellkarzinome. Tumorregression und Nekrosen führen zu einer Erweichung des Gewebes, mit glasiger oder schmutzig-beigefarbener Beschaffenheit. Aufgrund oft vorkommender rezidivierender Einblutungen zeigen diese Areale des Tumors starke Farbunterschiede von rot über braun zu schwärzlich. Insgesamt ergibt sich so das charakteristische Bild einer bunten Schnittfläche.

Mikroskopie

Der Tumor weist polygonale, teils kubische und zylindrische Zellen mit einem in der HE-Färbung klaren bis transparenten Zytoplasma auf. Diese Morphologie ist auf die massive Ansammlung von Glykogen und Lipiden zurückzuführen, die auf dem gestörten Glukose- und Glykogenstoffwechsel beruht. Diese Substanzen werden bei der üblichen Gewebeaufarbeitung herausgelöst, so dass das Zytoplasma im Schnittpräparat optisch leer erscheint und ein klarzelliger Aspekt entsteht. Die Tumorzellen sind in soliden, kompakten Verbänden angeordnet, manchmal bilden sie aber auch tubuläre und zystische Strukturen aus.

1.1.4 Das Nierenzellkarzinom vom papillären (chromophilen) Typ

Der papilläre Typ folgt mit einer Häufigkeit von 12% mit einigem Abstand dem Vorkommen der klarzelligen Nierenzellkarzinome.

Makroskopie

Dieser meist solitär vorkommende Tumor weist ein kontinuierliches Größenspektrum auf, das von wenigen mm bis hin zu einigen cm Durchmesser reicht. Der Tumor hat meist eine runde Gestalt und wird von einer breiten fibrösen Pseudokapsel umgeben. Nur selten sind die Tumoren multinodulär und unscharf begrenzt. Dies ist immer mit einer schlechten Differenzierung verbunden. Auf der Schnittfläche erscheint das tumoröse Gewebe kompakt und ist von beiger bis lehmgelber Farbe. Es liegt meist direkt unter der Capsula fibrosa renis. Lediglich die größeren Tumoren erheben sich halbkugelförmig über die Organoberfläche und sind wegen massiver Einblutungen von krümeligen Nekrosen durchsetzt. In einigen Fällen ist der Tumor fast völlig nekrotisch.

Mikroskopie

Für dieses Karzinom sind kleine kubische Zellen mit einem spärlichen basophilen Zytoplasma und runden, zentral liegenden Zellkernen charakteristisch. Mit steigender Dedifferenzierung nimmt die Eosinophilie des Zytoplasmas zu, die Tumorzellen werden höher. Der Tumor wächst stets papillär und verändert sich in schlecht differenzierten Anteilen hin zum soliden Wachstum.

1.1.5 Das Nierenzellkarzinom vom chromophoben Typ

Mit einer Häufigkeit von 5% ist dieser Typ unter den Nierenzellkarzinomen relativ selten.

Makroskopie

Die chromophoben Nierenzellkarzinome sind scharf vom umliegenden Gewebe abgegrenzt. Ein großer oder mehrere verschmelzende kleinere Tumorknoten werden durch zarte Bindegewebssepten getrennt und weisen eine lobulierte Oberfläche auf. Die Schnittfläche erscheint im fixierten Zustand typischerweise beigefarben, wobei ein höherer Differenzierungsgrad mit einer helleren Farbe korreliert und ein schlechterer

mit einer dunkleren blassbraunen Färbung einhergeht. Besonders charakteristisch ist das im Gegensatz zu den klarzelligen und papillären Karzinomen sehr einheitliche, homogene Erscheinungsbild der Schnittfläche, in dem nur vereinzelt Einblutungen, aber niemals Nekrosen zu erkennen sind.

Mikroskopie

Typisch für dieses Karzinom sind große polygonale Zellen mit einem hellen, feinnetzig retikulierten Zytoplasma und prominenter Zellmembran. Die Hellzelligkeit ist Ausdruck eines hohen Glykogengehaltes und einer Vermehrung der Mitochondrien. Diese Eigenschaften führen zu der typischen positiven Reaktion für kolloidales Eisen in der Hale-Färbung, womit das Zytoplasma diffus und die Membran deutlich betont angefärbt werden. Der Tumor zeigt meist ein solides, kompaktes Wachstum mit gelegentlichen Verkalkungen.

1.2 Tight junctions

1.2.1 Allgemeines

Vielzellige Organismen weisen eine funktionelle Gliederung in verschiedene Kompartimente oder Organe auf. Diese Gewebe zeichnen sich meist durch einen engen Verbund gleichartiger Zellen aus, die sich von anderen Geweben abgrenzen und so unterschiedliche Milieus aufrechterhalten können. Diese Funktionen werden meist von einem Komplex interzellulärer Verbindungsstrukturen getragen. Zu diesen gehören die sogenannten Tight junctions (TJ), Adherens junctions (AJ), Desmosomen und Gap junctions. Während die AJ und Desmosomen u.a. für eine mechanische Verbindung der Zellen untereinander verantwortlich sind, dienen die gap junctions der metabolischen Kopplung der Zellen und damit dem Austausch von Stoffen untereinander. Bei den Vertebraten spielen TJ eine zentrale Rolle, denn sie dichten den Interzellularraum in

epithelialen und endothelialen Geweben ab (SCHNEEBERGER ET AL. 1992; GUMBINER 1993; ANDERSON ET AL. 1995).

1.2.2 Morphologie

In elektronenmikroskopischen Analysen zeigte sich, dass bei TJ jeweils die äußere Schicht der Plasmamembranen der beteiligten Zellen einander stark angenähert oder gar miteinander fusioniert sind. Diese Stellen, in denen der Extrazellularraum komplett verschlossen ist, werden als „kissing points“ bezeichnet (STAEHLIN 1973). Hierdurch kommt es einerseits zur Abdichtung des luminalen Kompartiments vom periplasmatischen Bereich und damit dem Interstitium. Andererseits bedingt die TJ so die Polarisierung der beteiligten Zellen mit einer topographischen und funktionellen Separierung der Zellmembran in einen basolateralen und apikalen Bereich.

TJ bestehen aus einem in der Gefrierbruch-Methode darstellbaren verzweigten Netzwerk von Strängen, das die Zelle gürtelförmig an ihrer apikalen Seite umgibt. Je nach Gewebe unterscheidet sich das Netzwerk in Zahl der Stränge und in der Komplexität ihrer Anordnung (SCHNEEBERGER ET AL. 1992; GUMBINER 1993).

Zur Erklärung der Bildung der TJ standen lange Zeit zwei Modelle zur Verfügung: das Lipid- und das Protein-Modell. Im Lipid-Modell sollten die kissing points aus einander gegenüberliegenden zylindrischen Micellen bestehen (KACHAR ET AL. 1982). Das Protein-Modell hingegen besagt, dass die Stränge in den TJ aus integralen Membranproteinen bestehen, die linear aneinander gereiht mit denen der Gegenseite interagieren. Es bedurfte der Identifikation der am Aufbau der TJ beteiligten Komponenten, um das Lipid-Modell endgültig zu verlassen.

1.2.3 Proteine der Tight junction

Occludin

Occludin ist ein glykosyliertes integrales Membranprotein von ca. 60 kDa. Es weist vier Transmembrandomänen auf und sowohl der N- als auch der C-Terminus liegen intrazellulär. Occludin wurde erstmals aus den TJ von Hühnerleberzellen (FURUSE ET AL. 1993) isoliert und später auch in den TJ von Säugern (Ando-AKATSUKA ET AL. 1996) entdeckt. Man kennt mittlerweile zwei Isoformen des Proteins, die durch alternatives Spleißen des primären Genproduktes entstehen (MURESAN ET AL. 2000).

In elektronenmikroskopischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Occludin direkt in den TJ lokalisiert (SAITOU ET AL. 1997). Allerdings ist fraglich, ob Occludin essentiell bei der Ausbildung von TJ beteiligt ist. So wird zwar nach Transfektion der cDNA von Occludin in L-Fibroblasten, die von sich aus keine TJ bilden, ein kleines Netzwerk von Strängen ausgebildet, doch neigen nur wenige zur Verzweigung. Darüber hinaus sind einige Gewebe beschrieben, in denen TJ auch ohne das Vorkommen von Occludin ausgebildet sind, zum Beispiel zwischen Sertolizellen beziehungsweise den Myelinscheiden des ZNS (SAITOU ET AL. 1997). Des weiteren wird in Occludin-defizienten embryonalen Stammzellen wider Erwarten ein morphologisch intaktes TJ-Netzwerk ausgebildet (SAITOU ET AL. 1998). Die Existenz von solchen Occludin-freien TJ legte die Vermutung nahe, dass neben Occludin noch weitere transmembrane Proteine am Aufbau der TJ beteiligt sind.

Auch wenn intakte TJ ohne Occludin gebildet werden können, führt dessen Inhibierung mit einem gegen die zweite extrazelluläre Schleife von Occludin gerichteten Peptid zu einem massiven Abfall des transepithelialen Widerstandes (transepithelial resistance; TER) und einer damit verbundenen Zunahme des Mannitol-Flux (WONG ET AL. 1997). Funktionelle Defizienzen

Occludin-freier TJ könnten auch erklären, dass das Fehlen von Occludin in Occludin-defizienten Knock-out-Mäusen später zu Wachstumsretardierungen, chronischen Entzündungen und Epithelhyperplasien im Magen der betroffenen Tiere führt (SAITOU ET AL. 2000).

Claudine

Mit den Claudinen wurde eine Familie sequenzverwandter Proteine der TJ entdeckt, bei denen es sich um Transmembranproteine von ca. 22 kDa handelt. Sie zeichnen sich wie Occludin durch vier Transmembrandomänen aus, und N- und C-Terminus lokalisieren im Zytoplasma. Sie haben aber außer der strukturellen Ähnlichkeit keine Sequenzhomologien zu Occludin.

Bis heute sind mindestens 25 Mitglieder dieser Claudin-Familie entdeckt worden (MORITA ET AL. 1999; TSUKITA AND FURUSE 1999), die ein zell- und gewebespezifisches Verteilungsmuster aufweisen. So wird beispielsweise Claudin 5/TMVCF in Endothelien (MORITA ET AL. 1999) und Claudin 11/OSP in Sertolizellen und Oligodendrozyten (MORITA ET AL. 1999) gefunden.

Einige der Claudine sind unabhängig bereits früher beschrieben worden, allerdings ohne dass ihre physiologische Funktion erkannt wurde. So waren zum Beispiel der Clostridium perfringens Enterotoxin-Rezeptor (CPE-R), der heute als Claudin 4 bekannt ist, und das Oligodendrozyten-spezifische Protein (OSP), heute Claudin 11, schon seit längerer Zeit bekannt. Sequenzvergleiche mit den Claudinen und ihre Einbindung in die TJ erlauben jetzt eine Einordnung dieser Proteine in die Claudin-Familie.

In elektronenmikroskopischen Analysen zeigt sich, dass Claudine ausschließlich in den TJ lokalisieren. Die Transfektion entsprechender Claudin-cDNA in L-Fibroblasten führte zur Ausbildung von TJ-ähnlichen Strukturen, die ganz der regulären TJ-Struktur in situ entsprachen und zum Beispiel auch die typischen Verzweigungen aufwiesen (FURUSE ET AL. 1998; KUBOTA ET AL. 1999). Dieser entscheidende Unterschied zu Occludin (siehe 1.2.3.1) führte zu dem Schluss, dass Claudine die Grundstruktur der TJ

vorgeben. Occludin scheint erst später über verschiedene Mechanismen in die durch Claudine gebildete Struktur der TJ integriert zu werden (FURUSE ET AL. 1998).

Meist werden in einer Zellart mehrere Claudine gleichzeitig exprimiert. Obwohl der genaue Mechanismus des Zusammenbaus der TJ nicht vollkommen geklärt ist, wird angenommen, dass die Claudine als Hetero- und Homopolymere in der Zellmembran vorliegen, die dann mit den entsprechenden Polymeren der gegenüberliegenden Membran in homo- und heterophiler Weise interagieren (FURUSE ET AL. 1999; TSUKITA AND FURUSE 2000).

Die überaus wichtige Rolle und die vielgestaltige Beteiligung der Claudine an physiologischen Prozessen wird erst jetzt immer signifikanter, denn es werden eine zunehmende Zahl von Erkrankungen bekannt, die mit einem Defekt in bestimmten Claudingenen korreliert sind. So konnte gezeigt werden, dass eine in zwei pakistanischen Großfamilien beobachtete Form der autosomal-rezessiven Taubheit mit einem Defekt von Claudin 14 verbunden ist (WILCOX ET AL. 2001) und ein Defekt von Claudin 16 zum Krankheitsbild der familiären Hypomagnesiämie mit Hyperkalzurie und Nephrokalzinose führt (SIMON ET AL. 1999).

Periphere TJ-Proteine

Auf der intrazellulären zytoplasmatischen Seite der Zellmembran sind eine Reihe von Proteinen an die transmembranösen Komponenten der TJ assoziiert. Hierzu gehören Proteine wie ZO-1 (STEVENSON ET AL. 1986), ZO-2 (GUMBINER ET AL. 1991) und ZO-3 (BALDA ET AL. 1993). Diese stellen eine Verbindung zum Aktin-Mikrofilamentsystem her. Die ZO-Proteine weisen untereinander Bereiche mit Sequenzhomologien auf (ITOH ET AL. 1993; WILLOTT ET AL. 1993; JESAITIS ET AL. 1994; HAHSKINS ET AL. 1998). So wurden je 3 sogenannte PDZ-Domänen (proteinbindende Domäne, zuerst in PSD-95, DLG und ZO-1 beschrieben), je eine SH3-Domäne und je eine GUK-Domäne in den Proteinen beschrieben (TSUKITA AND FURUSE 2001).

Über ihre PDZ-Domänen binden die ZO-Proteine direkt an die C-Termini der Claudine.

Weitere Proteine an der zytoplasmatischen Seite der TJ sind Cingulin (CITI ET AL. 1988; CORDENONSI ET AL. 1999), das für die Anbindung des Aktin sorgt, 7H6-Antigen (ZHONG ET AL. 1993), Symplekin (KEON ET AL. 1996), G-Proteine (SAHA ET AL. 1998), die Einfluss auf die Regulation der TJ-Formation nehmen, sowie Rab 3b und Rab 13 (WEBER ET AL. 1994; ZAHRAOUI ET AL. 1994) und Sec6/Sec8-Homologa (GRINDSTAFF ET AL. 1998), die Funktionen im Transport von polarisierten Vesikeln haben. Aufgrund der Ausbildung dieses großen, hochmolekularen Komplexes auf der zytosolischen Seite der Membran besteht die Vermutung, dass dieser Adhäsionskomplex eine zentrale Rolle bei der Signaltransduktion sowie der Regulation von Proliferation, Differenzierung und Polarisierung von epithelialen und endothelialen Zellen spielen könnte (TSUKITA AND FURUSE 2001)

1.2.4 Funktionen der Tight junction

Zum Transport von Molekülen und Ionen zwischen den verschiedenen Kompartimenten eines Organismus bedarf es des gerichteten transzellulären und des parazellulären Transportes. Der transzelluläre Transport erfolgt durch spezifische Transportproteine oder –systeme an der apikalen und basolateralen Membran der Zellen. Der parazelluläre Transport erfordert hingegen, dass die TJ den Interzellularraum nicht inert verschließen, sondern ihre Permeabilität dem Bedarf anpassen (REUSS 1992; GUMBINER 1993; SPRING 1998). Dabei sind die TJ verschieden dicht und variieren je nach Gewebe in ihrer Permeabilität (MADARA 1998). Außerdem sind sie sowohl ionen- als auch größenselektiv (POWELL 1981). Eine Quantifizierung der Dichtigkeit der TJ von Zellschichten oder Geweben ist mit der Messung des transepithelialen Widerstandes (transepithelial resistance; TER) möglich. So wurde gezeigt, dass die Zahl der Stränge innerhalb eines TJ-Netzwerkes mit der Dichtigkeit der TJ logarithmisch korreliert ist. Der distale Tubulus in der Niere hat so zum Beispiel mit 4–7

Strängen einen deutlich höheren TER als der proximale Tubulus mit 1–2 Strängen (CLAUDE AND GOODENOUGH 1973; CLAUDE 1978).

Dass die Unterschiede in der Permeabilität nicht nur auf die Anzahl der Stränge zurückzuführen ist, zeigen die Ergebnisse von STEVENSON ET AL. (1988). Obwohl die verschiedenen Subtypen der MDCK-Zellen (Madin-Darby canine kidney) eine etwa gleiche Anzahl von Strängen in ihrem TJ-Netzwerk aufweisen, unterscheiden sie sich deutlich in ihrem TER. Dies deutet auf eine verschiedenartige Zusammensetzung der TJ hin. Dass hierfür die Claudine wesentlich sind, wurde durch SONODA ET AL. (1999) belegt. Hierbei zeigten die Autoren, dass zwei Subtypen der MDCK-Zelllinie unterschiedliche Claudine exprimieren. So bildet der Subtyp I Claudin 1 und Claudin 4 und zeichnet sich dabei durch einen hohen TER aus, während der Subtyp II hauptsächlich Claudin 2 bildet und einen geringen TER aufweist. Das Unterbinden der Claudin 4-Expression in MDCK I führt zu einer drastischen Verringerung des TER in diesem Subtyp. Gleiches wird durch die exogene Expression von Claudin 2 in diesen Zellen erreicht. Der TER sinkt dann auf ein vergleichbares Niveau wie bei MDCK II-Zellen. Eine exogene Expression von Claudin 3 bleibt in beiden Zellsystemen ohne Auswirkung (TSUKITA AND FURUSE 2001).

Diese Beobachtungen können einerseits auf einer unterschiedlichen Ausprägung der TJ-Stränge durch die einzelnen Claudine beruhen. So weisen solche Stränge, die durch Claudin 1 gebildet werden, eine deutlich höhere Tendenz zu Verzweigungen auf (FURUSE ET AL. 1998), während Claudin 11 beispielsweise eher parallel ausgerichtete Stränge bildet (MORITA ET AL. 1999). Andererseits wird auch diskutiert, dass einzelne Claudine sich porenartig zusammenlagern und zwischen offenen und geschlossenen Zuständen wechseln können (CLAUDE 1978; CERIJO ET AL. 1989; REUSS 1992). In diese Richtung deuten auch Untersuchungen der durch einen Claudin 16/Paracellin 1-Defekt verursachten erblichen Hypomagnesämie. Hier wird vermutet, dass durch Claudin 16 ein Magnesium-selektiver

Ionenkanal gebildet wird (SIMON ET AL. 1999), dessen Fehlen das genannte Krankheitsbild erklärt.

1.2.5 TJ in der Niere

Die Aufgaben der Niere erfordern es, dass die TJ entlang der verschiedenen Nephronsegmente unterschiedlich dicht sind. So kommen im proximalen Tubulus der Niere, wo eine rege Resorption von Glucose, Aminosäuren und Elektrolyten erfolgt, überwiegend TJ vom durchlässigeren „leaky“ Typ vor. Je weiter die Resorption und Konzentrierung des Harns vorangeschritten ist, desto dichter werden die TJ. Diese Eigenschaft erreicht im Sammelrohr ihr Maximum.

Entlang des Tubulussystems von Nagernieren wurden schon eine Reihe von TJ-Proteinen bezüglich ihrer tubulusspezifischen Verteilung untersucht. So beschreiben GONZALES-MARISCAL ET AL. (2000) die Verteilung der TJ-Proteine ZO-1, ZO-2 und Occludin entlang des Tubulussystems von Kaninchennieren. ENCK ET AL. (2002) und KIUCHI-SAISHIN ET AL. (2002) untersuchten die Verteilung verschiedener Claudine im Tubulussystem von Mäusenieren. Über die Verteilung der Claudine in menschlichem Nierengewebe liegen bislang noch keine Daten vor.

1.3 Ziele der Arbeit

Die oben beschriebenen Daten von Nagernieren zeigen, dass sich anhand der Analyse von TJ-Proteinen möglicherweise ein neues, hochspezifisches System zur Unterscheidung der einzelnen Nephronsegmente ergibt. Somit liegt es nahe zu fragen, inwieweit sich diese TJ-Proteine auch in den verschiedenen Nierenzellkarzinomen darstellen lassen und ob auf diese Weise eine nähere Klärung der nach wie vor z.T. umstrittenen Histogenesewege möglich sein könnte. Daher ist das Ziel dieser Arbeit, mit immunhistochemischen Analysen die zelltypspezifischen Expressionsmuster der verschiedenen Claudine (Cldn 1, 2, 3, 4, 8 und 11) sowie deren Beziehung zu den länger bekannten TJ-Markern ZO-1 und

Occludin in normalem menschlichen Nierengewebe zu untersuchen und mit den kürzlich publizierten Ergebnissen in der Niere von Nagetieren zu vergleichen. Anschließend soll die Expression dieser Moleküle in den drei wichtigsten Typen des menschlichen Nierenzellkarzinoms erforscht werden. Diese sind das klarzellige, das papilläre und das chromophobe Nierenzellkarzinom.

Bei der Untersuchung der Tumoren wird zwei Fragestellungen nachgegangen. Zunächst soll geklärt werden, ob sich in den Karzinomen überhaupt TJ nachweisen lassen. Dies ist nach unserem Wissensstand, insbesondere auf elektronenmikroskopischen Niveau, bisher für die Nierenzellkarzinome noch nicht gelungen. Sollten einzelne Claudine nachgewiesen werden können, so soll dies mit dem Expressionsmuster der Claudine entlang des normalen Nephron verglichen werden, um so mögliche Aussagen zur Differenzierung und Histogenese der Nierenzellkarzinome treffen zu können. Diese könnten in der gegenwärtigen Diskussion über die Abstammung der Nierenzellkarzinome wichtige Hinweise liefern und zur Klärung des Sachverhaltes beitragen. Schließlich soll sich zeigen, ob verschiedene Mitglieder der Claudin-Familie sich als Tumormarker eignen.

2 Material und Methoden

2.1 Geräte

Allgemeine Geräte:

Magnetrührer (Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland)

pH-Meter (WTW, Weilheim, Deutschland)

Laborwaage (Kern & Sohn, Balingen-Frommern, Deutschland)

Kühl- und Gefriergeräte (Liebherr, Biberach an der Riss, Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)

Immunhistochemie:

Einbettautomat VIP (Sacura, Japan)

Wasserbäder (GFL, Burgwedel, Deutschland)

Mikrotom SM 2000 R (Leica, Bensheim, Deutschland)

Inkubationsschränke (Ehret, Emmendingen, Deutschland)

Mikrowellengerät (Panasonic, Hamburg, Deutschland)

Mikroskope (Olympus, Hamburg, Zeiss, Göttingen, Deutschland)

2.2 Enzyme und Chemikalien

Die erforderlichen Chemikalien, Enzyme und Antikörper (in Analysenqualität) wurden bezogen von:

Merck (Darmstadt, Deutschland)

Riedel-de-Häen (Seelze, Deutschland)

Zymed (Berlin, Deutschland)

Immunotech (Paris, Frankreich)

Cedarlane (Ontario, Canada)

Vector (Burlingame, CA, USA)

Einzelheiten zu den verwendeten Primär- und Sekundärantikörpern werden im Abschnitt 2.5.2 dargestellt.

2.3 Biologisches Material

Bei dem hier verwendeten menschlichen Nierengewebe handelt es sich um intraoperativ gewonnenes Material, das die Klinik für Urologie der Philipps-Universität Marburg in den Jahren 1999 bis 2002 zur Diagnostik in das Institut für Pathologie Marburg eingeschendet hat. Nach Fixation in Formalin, Zuschnitt und Einbettung in Paraffin ging das Gewebe in die Routinediagnostik ein. Danach standen die Gewebepblöcke für die Untersuchungen dieser Arbeit zur Verfügung. Außer Alter und Geschlecht der Patienten wurden keine personenbezogenen Daten für die Studie herangezogen, so dass es sich um eine anonymisierte Studie an Archivmaterial handelt.

2.4 Puffer und Lösungen

10x PBS-Puffer	160 g	NaCl
	4 g	KCl
	23,3 g	Na ₂ PO ₄ x2 H ₂ O
	4 g	KH ₂ PO ₄
	ad 2 l	aqua dest
	pH	7,4
10x TBS-Puffer	53 g	NaCl
	12 g	Tris
	ad 1 l	aqua dest
	pH	7,4
0,05 M Tris-HCl-Puffer	60,57 g	Tris
	ad 1 l	aqua dest
	pH	7,4
10 mM Na-Citrat-Puffer	2,941 g/l	tri-Na-Citrat-Dihydrat
	pH	6,0

Trypsinlösung (0,1%), Stammlösung	300 mg 300 mg ad 300 ml pH	Trypsin CaCl ₂ Tris-HCl-Puffer 7,8
Trypsinlösung (0,001%), Gebrauchslösung	1 ml ad 100 ml	Stammlösung Tris-HCl-Puffer
Protease 24 (8,8 Units/mg)	0,013 g ad 60 ml portioniert abfrieren	Protease aqua dest
2% MP-PBS	2 g ad 100 ml täglich frisch ansetzen	Magermilchpulver PBS

2.5 Die Immunhistochemie

2.5.1 Vorbereitung der Gewebe

Von den oben beschriebenen (2.3) in Paraffin eingebetteten Gewebestücken werden mit einem Mikrotom Schnitte von einer Dicke von etwa 5 µm angefertigt. Diese werden auf haftbeschichtete Objektträger (Superfrost R plus, Menzel-Gläser, Braunschweig) aufgezogen und im heißen Wasserbad (60°C) geglättet. Anschließend werden die Schnitte über Nacht bei 60 °C getrocknet. Bei Bedarf können die Schnitte nun kühl und dunkel gelagert werden. Ansonsten werden die Schnitte am nächsten Tag je 3x 10 min in Xylol entparaffiniert und dann in einer absteigenden Alkoholreihe (100%, 96%, 70% und 50% Ethanol) hydriert. Im folgenden Schritt wird die endogene Peroxidase des Gewebes blockiert. Hierzu gibt man die Schnitte 30 min in 200 ml Methanol mit 6 ml 30% H₂O₂. Nach Spülen mit Aqua dest. erfolgt eine Mikrowellenbehandlung, bei der das Gewebe aufgelockert wird und durch die Formalinfixierung verborgene antigene Epitope wieder zugänglich gemacht werden. Hierzu werden die Schnitte in 10 mM Na-Citrat-Puffer (4°C) je nach Spezifikation des Antikörpers und Beschaffenheit des Gewebes für 3–5 Zyklen à 5 min bei

600 Watt erhitzt. Der verdunstete Puffer muss nach jedem Zyklus ergänzt werden, um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern. Danach müssen die Schnitte für etwa 15 min bei Raumtemperatur abkühlen und werden anschließend mit TBS-Puffer gespült. Es schließt sich ein sehr milder Gewebeandau mit einer 0,001%igen Trypsinlösung an. Die Schnitte werden dazu in die Lösung gegeben und für 10-15 min bei 37°C inkubiert. Danach wird nochmals mit Aqua dest. gespült. Beim Antikörper ZO-1 entfällt die Mikrowellenbehandlung, und als Gewebeandau wird eine Protease-24-Inkubation (Sigma, St. Louis, MO, USA) für 10 min bei 37°C durchgeführt. Für die nun folgenden Schritte werden die Objektträger in das Färbesystem Sequenza (Shandon, Frankfurt) eingespannt, bei dem die Inkubationen in einem Kapillarspalt erfolgen und das eine einfache Handhabung bei der Zugabe von Lösungen und Antikörpern möglich macht. Jetzt wird zunächst das endogene Biotin im Gewebe abgesättigt, um später unspezifische Färbungen zu verhindern. Hierzu werden je Schnitt 100µl der entsprechenden Lösung (4 Tropfen Blocking-Substanz/ 1000µl PBS, Vector, Burlingame, CA, USA) zugegeben und für 15 min inkubiert. Es schließt sich ein Spülvorgang mit PBS an. Anschließend werden je Schnitt 100µl Normalserum vom Pferd (1:10 in PBS, Vector, Burlingame, CA, USA) zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen zugegeben und für 20 min inkubiert. Nun sollte kein Spülvorgang mit PBS mehr erfolgen. Die Schnitte stehen nun zur Nachweisreaktion mit Antikörpern bereit.

2.5.2 Antikörperreaktionen

Es werden je 100µl des Primärantikörpers in geeigneter Verdünnung (siehe Tabelle 2.1) pro Schnitt zugegeben und dann für 1 h bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Nach Spülen mit PBS erfolgt der Nachweis des gebundenen Primärantikörpers durch den Sekundärantikörper. Dieser muss gegen die Spezies gerichtet sein, in der der Primärantikörper generiert wurde. An die hier verwendeten Sekundärantikörper (anti-Maus-IgG, anti-Kaninchen-IgG, Vector, Burlingame, CA, USA) ist Biotin gekoppelt, das später für die Farbreaktion genutzt wird. Es werden je Schnitt 100µl Sekundärantikörper (1:100 in PBS) zugegeben, für weitere 30 min inkubiert und anschließend mit PBS gespült.

Tabelle 2.1: Primärantikörper und Gewebepvorbereitung

Antigen	Antikörper	Hersteller	Verdünnung	Mikrowelle	Gewebeandau
Villin	MAk (ID2C3)	Immuno-tech	1 : 200	3 x 5 min	—
CK 19	MAk (Ks 19.1)	Progen	1 : 50	3 x 5 min	Trypsin
THP	MAk (10.32)	Cedarlaine	1 : 300	3 x 5 min	—
ZO-1	PAk	Zymed	1 : 100	—	Protease 24
Occludin	MAk (OC-3F10)	Zymed	1 : 100	3 x 5 min	Trypsin
Claudin 1	PAk	Zymed	1 : 200	3 x 5 min	Trypsin
Claudin 1*	PAk	Zymed	1 : 200	3 x 5 min	Trypsin
Claudin 2	PAk	Zymed	1 : 100	3 x 5 min	Trypsin
Claudin 2	PAk	Prof. Dr.Tsukita	1 : 1000	5 x 5 min	Trypsin
Claudin 3	PAk	Zymed	1 : 200	5 x 5 min	Trypsin
Claudin 3	PAk	Prof. Dr.Tsukita	1 : 1000	5 x 5 min	Trypsin
Claudin 4	PAk	Prof. Dr.Tsukita	1 : 1000	5 x 5 min	Trypsin
Claudin 4	MAk	Zymed	1 : 200	3 x 5 min	Trypsin
Claudin 8	PAk	Prof. Dr.Tsukita	1 : 1000	5 x 5 min	Trypsin
Claudin 11	PAk	Prof. Dr.Tsukita	1 : 1000	5 x 5 min	Trypsin

Claudin 1* hat die Lot-Nr. 1162834. Dieser Antikörper wurde anfangs für die Analysen verwendet. Wegen des Verdachtes auf Kreuzreaktivität wurde in den Untersuchungen dieser Antikörper* durch einen neueren Antikörper gegen Claudin 1 (Lot-Nr. 11167698) ersetzt.

2.5.3 Nachbereitung der Gewebe und Dokumentation

Nun werden je 100µl des ABC-Komplexes (ABC-Kit, Vector, USA), der für eine Verstärkung des Signals sorgt, zu den Schnitten gegeben. Entsprechend der Herstellerangaben werden 20µl Komponente A und 20µl Komponente B in 1000µl PBS verdünnt. Wieder erfolgt eine Inkubation für 30 min und ein Spülvorgang mit PBS. Nun werden die Schnitte wieder aus dem Sequenza-Färbesystem entnommen und von nun an in Glasküvetten weiterbehandelt. Im folgenden Arbeitsschritt wird den Schnitten das Substrat für die Farbreaktion zugegeben, die durch das an den ABC-Komplex

gekoppelte Enzym vermittelt wird. Hierzu werden 200ml DAB (3,3'-Diaminobenzidin, Sigma, München) mit 1mg DAB je 1ml 0,05 M Tris-HCl-Puffer angesetzt und die Reaktion durch Zugabe von 1000µl 30% H₂O₂ gestartet. Nach 5-10 min wird die Reaktion durch Spülen unter fließendem Leitungswasser gestoppt und die Schnitte dann in Aqua dest. überführt. Anschließend erfolgt die Gegenfärbung des Gewebes in Mayers Hämalaun (1:5 in Aqua dest.) und eine weitere Spülung unter fließendem Wasser. Nach erneuter Überführung in Aqua dest. schließt sich eine Dehydratation in einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 96% und 100% Ethanol) und 3x Xylol für je 5 min an. Danach können die Schnitte mit Entellan[®] (ProSciTech, Queensland, Australien) eingedeckt werden. Von nun an sind die Schnitte bei dunkler Lagerung für einige Jahre haltbar.

Die immunhistochemisch gefärbten Präparate werden mit einem Lichtmikroskop mit Objektiven 4- und 10-facher Vergrößerung durchmustert und dann in 20- und 40-facher Vergrößerung auf die Farbreaktion einzelner Zellen untersucht. Die gefärbten TJ-Strukturen im Gewebe stellen sich in der Regel als wabenartiges Geflecht dar, das die Zellen apikal umgibt, die – je nach Schnittebene – bisweilen lediglich punktförmig erkennbar sind.

Um die Präparate zu dokumentieren, werden diese am Fotomikroskop (Vanox AHB3, Olympus, Hamburg) mit Kunstlichtfilmen (EPY 64T) der Firma Kodak (Stuttgart) fotografiert und anschließend Dias angefertigt. Die Dias werden eingescannt (ScanMaker 35t plus, Mikrotek) und bezüglich Farbtönung und Kontrast erfolgt eine digitale Nachbearbeitung der Aufnahmen (AdobePhotoShop, Adobe Systems Incorporated, USA).

2.6 Statistische Methoden

Mit den statistischen Analysen soll geprüft werden, ob die Expressionshäufigkeit zwischen den verschiedenen Tumorentitäten Unterschiede aufweist. Dazu wird die Expression der einzelnen Claudine in jeweils zwei der Tumoren miteinander getestet. Es ergeben sich bei drei untersuchten Tumorentitäten für ein Claudin jeweils drei mögliche

Testkombinationen. Aufgrund dieser Fragestellung und der Anordnung der Merkmale ist folgende **Null-Hypothese** zu formulieren:

Die Expressionshäufigkeit des Claudin X ist in beiden zu untersuchenden Tumorentitäten gleich. Es besteht also kein Unterschied zwischen beiden.

Entsprechend lautet die **Gegenhypothese**:

Claudin X ist bei Tumor 1 und Tumor 2 unterschiedlich exprimiert.

Dabei handelt es sich um eine zweiseitige Gegenhypothese, denn es ist nicht von Belang, in welchem der getesteten Tumoren das Claudin X vorkommt.

Die in dieser Arbeit vorliegenden Daten sind binär verteilt, denn bei der Auswertung werden die Expressionsmuster mit positiv oder negativ bewertet. Es gibt also zwei Merkmalsausprägungen – positiv und negativ. Wenn nun ermittelt werden soll, ob sich die Tumoren untereinander in ihrer Claudin-Expression unterscheiden, ist es sinnvoll, je zwei der drei Tumorentitäten gegeneinander statistisch zu testen. Aus dieser Fragestellung ist ersichtlich, dass sich eine Anordnung der Merkmale in Form einer Vierfeldertafel ergibt. Für jede Möglichkeit der Testung, also Klarzellig versus Papillär, Klarzellig versus Chromophob und Papillär versus Chromophob, werden Kontingenztafeln analog zum folgenden Beispiel aufgestellt.

Tabelle 2.2: Beispiel für eine Kontingenztafel

	Positiv	Negativ	Summe
Tumor 1	a	b	a+b
Tumor 2	c	d	c+d
Summe	a+c	b+d	a+b+c+d

Es wird nun der exakte Test nach FISHER und YATES (nach ZÖFEL, 1984) ausgeführt. Dieser Test ersetzt den Chiquadrat-Vierfeldertest bei sehr kleinen Häufigkeiten, da für den Chiquadrat-Test alle Gruppen größer als fünf sein müssen. Dies ist in der hier vorliegenden Arbeit nicht gegeben, da es sich um eine orientierende Studie mit geringen Fallzahlen handelt. Dieser Test nach FISHER und YATES erlaubt es, das Signifikanzniveau sehr genau zu bestimmen, da in die Berechnung neben den

Wahrscheinlichkeiten der gegebenen Verteilung auch die einer „unwahrscheinlicheren“ Verteilung bei gleichen Randsummen eingehen. Mit diesem Verfahren wird auf Unterschiede getestet. Es wird geprüft, ob sich die Häufigkeit der Claudin-Expression in den verschiedenen Tumoren unterscheidet. Allerdings kann dieser Test keine Aussage darüber machen, wie ausgeprägt die ermittelten Unterschiede sind. An dieser Stelle müssten andere Tests herangezogen werden.

Im exakten Test von FISHER und YATES werden die p-Werte anhand folgender Formel aus den Daten der Kontingenztafel errechnet:

$$p = \frac{\binom{a+c}{a} \times \binom{b+d}{b}}{\binom{a+b+c+d}{a+b}}$$

Anschließend werden aus der obigen Kontingenztafel die unwahrscheinlicheren Verteilungen ermittelt. Dazu wird schrittweise der kleinere Wert in jeder Zeile um 1 verringert und der größere Wert um eins erhöht, solange bis in einem der Felder die Zahl Null auftritt. Es entsteht also folgende Tabelle:

Tabelle 2.3: 2. Beispiel für eine Kontingenztafel

	Positiv	Negativ	Summe
Tumor 1	a-1	b+1	a+b
Tumor 2	c+1	d-1	c+d
Summe	a+c	b+d	a+b+c+d

Im nächsten Schritt ergibt sich folgende Tafel:

Tabelle 2.4: 3. Beispiel für eine Kontingenztafel

	Positiv	Negativ	Summe
Tumor 1	a-2	b+2	a+b
Tumor 2	c+2	d-2	c+d
Summe	a+c	b+d	a+b+c+d

Die Gesamthäufigkeit in den Kontingenztafeln verändert sich also nicht. Es werden lediglich die unwahrscheinlicheren Verteilungen ermittelt. Dieses Verfahren wird nun solange fortgesetzt, bis in einem Feld eine Null auftritt. Dann wird abgebrochen und nun die zugehörigen p-Werte ermittelt. Auch hier wird die oben genannte Formel verwendet. Anschließend werden die einzelnen p-Werte addiert, und man erhält so den gesamten p-Wert für diese Rechnung.

Im folgenden sind alle Rechenschritte nochmals vereinfacht in der exakten Abfolge aufgeführt, nachdem die Kontingenztafeln sowie die unwahrscheinlicheren Verteilungen ermittelt worden sind.

Schritt 1: Berechnung von:

$$f = \binom{a+b+c+d}{a+b}$$

Schritt 2: alle ermittelten unwahrscheinlicheren Verteilungen mit gleich bleibenden Randsummen werden eingesetzt in:

$$w_j = \binom{a_j + c_j}{a_j} \times \binom{b_j + d_j}{b_j}$$

und die sich ergebenden Binominalkoeffizienten berechnet. Dabei bezeichnet der Index ($j = 0, \dots, m$) die betreffenden Verteilungen. Es sind a_0, b_0, c_0, d_0 mit a, b, c, d gleichzusetzen, wohingegen mit den höheren Indizes die unwahrscheinlicheren Verteilungen bezeichnet sind. Daher wird dieser Komplex also in mehreren nacheinanderfolgenden Schritten für jede aufgestellte Verteilung berechnet.

Schritt 3: Berechnung der gesuchten Wahrscheinlichkeit p :

$$p = \frac{1}{f} \times \sum_{j=0}^m w_j$$

Dann entsprechen alle $p < 0,05$ einer Signifikanz auf der Stufe von 5%.

Da es sich bei der hier vorliegenden Untersuchung um sehr geringe Fallzahlen handelt, soll noch eine Adjustierung der p-Werte vorgenommen werden, um die Signifikanz zu präzisieren. Dazu wird die **HOLM-Prozedur** verwendet. Im ersten Schritt werden alle p-Werte der Größe nach geordnet, wobei mit dem kleinsten p-Wert begonnen wird. Anschließend wird der kleinste p-Wert mit $p = 0,05/18$ (3 Tumorentitäten x 3 Claudine x 2 = 18 einseitige Hypothesen) verglichen. Der nächstgrößere p-Wert wird nun mit $p = 0,05/17$ verglichen. In aufsteigender Reihenfolge werden nun alle Werte mit $p = 0,05/16$, $p = 0,05/15$ usw. verglichen, bis dieser zu vergleichende p-Wert nicht mehr unterschritten wird. In diesem Augenblick muß der Vergleich abgebrochen werden. Für alle vorherigen p-Werte kann die Nullhypothese verworfen werden. Bei den verbleibenden kann die Nullhypothese nicht verworfen werden. Dies sagt aber nicht aus, dass kein Unterschied in der Expression der getesteten Claudine besteht. Dies müssten weitere Tests zeigen.

Die Auswertung der Expression in den Tumoren kann nicht verblindet durchgeführt werden, da der jeweilige Tumortyp aufgrund seiner morphologischen Charakteristika beim Blick durchs Mikroskop erkannt oder zumindest vermutet werden kann. Es liegt also eine **Nicht-Verblindbarkeit** vor. Eine Verblindung ist bei der Auswertung dieser Fragestellung jedoch auch nicht unbedingt erforderlich, da die Beurteilung hinsichtlich positiver oder negativer Färbungen sehr eindeutig zu machen ist. Es liegt hier bei der Bewertung keine Fragestellung vor, die nach persönlichem Ermessen beurteilt werden muss, sondern es liegt eine klar zu treffende Ja/Nein-Entscheidung vor.

3 Ergebnisse

Insgesamt werden Analysen an Nierenzelltumoren von 28 Patienten durchgeführt, von denen elf als klarzellige, zehn als papilläre und sieben als chromophobe Nierenzellkarzinome klassifiziert sind. Diese Diagnosen sind in unserem Institut nach routinemäßigem Eingang der Gewebe aus der Klinik für Urologie in Marburg vorgenommen worden, wobei in allen Fällen eindeutige pathomorphologische Kriterien vorliegen. Da bei drei der analysierten Gewebe das zugehörige tumorfreie Nierengewebe stark pathologisch verändert ist, werden nur 25 Normalnierengewebe in die Untersuchungen eingebracht.

Zur immunhistochemischen Untersuchung werden zum einen Antikörper gegen zwei bereits etablierte TJ-Proteine, Occludin und ZO-1, verwendet. Des weiteren werden gegen verschiedene Claudine gerichtete Antikörper eingesetzt. Dies sind im Speziellen polyklonale Antikörper vom Kaninchen gegen Claudin 1, 2, 3 sowie ein monoklonaler Antikörper gegen Claudin 4 der Firma Zymed. Außerdem werden polyklonale Kaninchen-Seren gegen Claudin 4, 8 und 11 freundlicherweise von Prof. Dr. Tsukita, Kyoto, Japan zur Verfügung gestellt.

Der Anteil von Färbungen der TJ in reagierenden Tubulusquerschnitten wird auf die Gesamtheit des jeweiligen Tubulustyps bezogen. Dabei erfolgt keine Berücksichtigung der Intensität der Färbung. In gleicher Weise werden die positiven Tumorzellen ins Verhältnis zu den gesamten Tumorzellen gestellt. Die Reaktionen werden entsprechend der folgenden Tabelle bewertet.

Tabelle 3.1: Klassifizierung immunhistochemischer Befunde

Abkürzung	Klassifizierung	Anteil positiver Reaktionen
0	Negativ	0%
1	Mäßig positiv	1-50%
2	Stark positiv	51-100%

Alle Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen sind in Tabelle I für Nierengewebsreaktionen und Tabelle II für Tumorreaktionen des Anhangs zusammengefasst. In den Tabellen im Text sind die Bewertungen mäßig und stark positiv zur übersichtlicheren Darstellung zusammengefasst worden. Die Auswertungen zur Betrachtung des Normalnierengewebes finden sich im folgenden Text. Bei den Tumoren wird hinsichtlich einer Zusammenfassung auch auf die Tabellen des Statistikeils (Kapitel 3.6) verwiesen.

3.1 Immunhistochemische Befunde im normalen Nierengewebe

Die Analysen werden an Nierengeweben von 25 Patienten vorgenommen. Auf diese Fallzahl beziehen sich alle später gemachten quantitativen Aussagen zu den Reaktionen. Die untersuchten normalen Nierengewebe stammen alle von Tumornephrektomie-Präparaten. Zur hier vorgestellten Untersuchung mittels Immunhistochemie werden die Gewebsschnitte so gewählt, dass die gesunden Nierenanteile durch den malignen Prozess mikroskopisch nicht oder nicht nennenswert pathologisch verändert sind. Die Untersuchung des normalen Nierengewebes erfolgt parallel zur Auswertung des tumorösen Gewebeanteils, da beide zumeist auf einem Gewebeblock enthalten, dabei aber klar voneinander getrennt sind. Die unterschiedlich rasche Fixierung, bedingt durch je nach Präparatebeschaffenheit unterschiedliche Formalinpenetration führt bisweilen zu einem differierenden Grad der Gewebeerhaltung der einzelnen Nieren. So können insbesondere die proximalen Tubuli von Autolyse betroffen und dadurch nicht immer eindeutig zu beurteilen sein. Hierin sowie in unterschiedlich langen Fixierungszeiten sind vermutlich auch die

Unterschiede der verschieden starken Ausprägungen der Reaktionen zwischen den verschiedenen Nierenproben begründet.

Die positiven Reaktionen bestehen meist aus einer feinen linearen Markierung an den apikalen Zellgrenzen. Bei Zellen, die im Anschnitt getroffen werden, stellt sich diese Linie als ein Gebilde aus zwei apikal-seitlichen Punkten dar. Wenn die Zellen beim Schnitt tangential getroffen werden, kommt ein honigwabenartiges, lineares Muster zur Darstellung. Dieses Färbemuster wird im Folgenden als TJ-Muster bezeichnet.

Zur Beurteilung des Auftretens der einzelnen Claudine entlang des Nephrons werden diese im Vergleich mit drei anderen Antikörpern gegen Nephronsegmentmarker untersucht. So werden zur Immunhistochemie vier direkt aufeinanderfolgende Serienschnitte von circa 5 µm Dicke verwendet. Von diesen werden drei Schnitte anschließend mit Antikörpern gegen Villin, Tamm-Horsfall-Protein (THP) und Cytokeratin 19 (CK 19) analysiert. Der vierte Serienschnitt wird gegen das zu untersuchende Claudin gefärbt. Anschließend werden sich entsprechende Ausschnitte sowohl aus der Rinde als auch aus dem Mark fotografisch dokumentiert. Von den vorher genannten Antikörpern ist bereits bekannt, dass die gegen Villin gerichteten Antikörper spezifisch nur die Nephronabschnitte der proximalen Tubuli färben, THP-spezifische die distalen Tubuli (STÖRKEL 1993). CK 19-spezifische Antikörper markieren sowohl Sammelrohre als auch die Henle-Schleife. Dies erlaubt nun eine genaue Zuordnung der Reaktion des jeweiligen Claudins zu den einzelnen Abschnitten des Tubulussystems. Diese Vergleiche sind in den folgenden Bildtafeln für jeden der untersuchten Antikörper dargestellt, wobei auch Occludin und ZO-1 einbezogen sind.

3.1.1 Occludin

Occludin wird in allen Anteilen des Nephrons in unterschiedlicher Stärke - von besonderer Intensität aber in den distalen Abschnitten - nachgewiesen. Die Bowman-Kapsel der Glomerula zeigt in 17 der betrachteten Normalnierengewebe keine Reaktion, in den übrigen acht Fällen kommt das äußere Blatt der Kapsel zu Anfärbung.

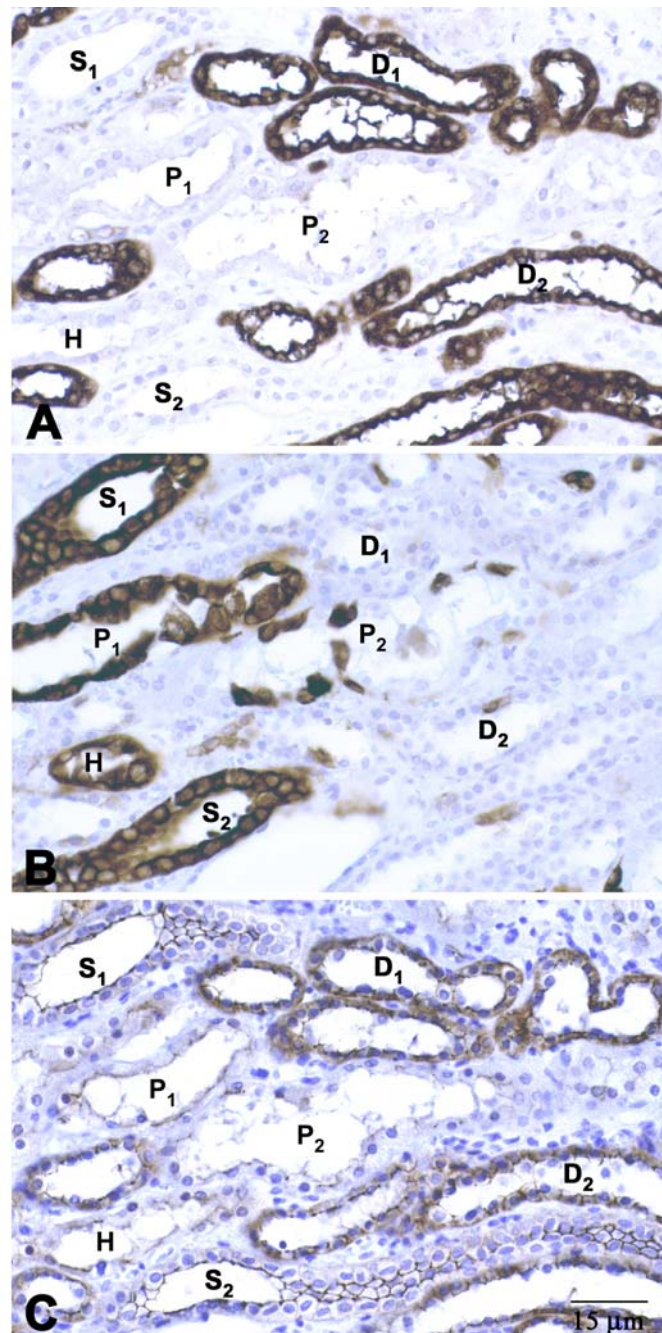


Abbildung 3.1: Immunhistochemische Analysen von **Occludin (C)** im distalen Normalnierengewebe (Markstrahl) im Vergleich mit THP (**A**) und CK 19 (**B**).

Konsequente Paraffinschnitte von Normalnierengewebe wurden immunhistochemisch mit den segment-spezifischen Markern THP (**A**) und CK 19 (**B**) analysiert und mit der immunhistochemischen Analyse der Expression von Occludin (**C**) verglichen. THP (**A**) ist spezifisch in den Zellen der distalen Tubuli (D₁, D₂) nachzuweisen, während mit dem Antikörper gegen CK 19 (**B**) die Henle-Schleife (H) und Sammelrohre (S₁, S₂) zur Anfärbung kommen. Des weiteren ist CK 19 (**B**) mosaikartig in den gestreckten Anteilen der proximalen Tubuli (P₁, P₂) zu finden. Occludin (**C**) wird in allen gezeigten Nephronabschnitten - proximalen Tubuli, dünnen Ästen der Henle-Schleife, distalen Tubuli und Sammelrohren - exprimiert

(vergleiche **A**, **B** und **C**). In den Sammelrohren (S_1 , S_2) ist ein deutliches Wabenmuster um die Zellgrenzen zu erkennen. In den distalen Tubuli (D_1 , D_2) herrscht eine diffuse zytoplasmatische Reaktion vor, doch sind auch klassische TJ-Muster zu erkennen. Die Färbung in der Henle-Schleife (H) ist sehr zart, weist aber auch TJ nach. In den gestreckten Anteilen der proximalen Tubuli (P_1 , P_2) kommen die TJ je nach Erhaltung des Tubulus als sehr feine Strukturen zur Darstellung. Bei den hier gezeigten Bildern handelt es sich um die Anschnitte eines Markstrahls dieser Niere.
Strichmarke: 15 μm .

Es stellt sich ein feines Muster mit einzelnen Linien und Punkten in diesem dünnen einschichtigen Epithel dar. In den proximalen Tubuli kommt es in allen 25 Fällen zum Nachweis von Occludin (Abb. 3.1, Bild C). Die Reaktionen sind allerdings sehr heterogen und vereinzelt. Wie in Abbildung 3.1 (Bild C) zu sehen ist, wird Occludin in den Zellen der Henle-Schleife in unterschiedlicher Intensität angefärbt, wobei das klassische TJ-Netzwerk nur sehr schwach zu erkennen ist. Von den 25 untersuchten Nieren lassen alle Fälle eine Reaktion mit Occludin in der Henle-Schleife erkennen. Die Färbung der TJ ist in den distalen Tubuli weitaus deutlicher zu erkennen. Wie in Abbildung 3.1 (Bild C) zu sehen, ist das feine Netzwerk in den distalen Tubuli besonders kräftig markiert. Alle 25 Nieren reagieren in den distalen Tubuli positiv mit dem Antikörper gegen Occludin. Am deutlichsten ist die Reaktion von Occludin in den Sammelrohren ausgeprägt. Hier ist immer ein feines, im Tangentialschnitt honigwabenartiges Netzwerk zu sehen, das die Zellen umschließt (Abb. 3.1, Bild C). Es reagieren alle 25 Fälle stark positiv.

Tabelle 3.2: Expression von Occludin

	Glomerulum	Proximaler Tubulus	Henle Schleife	Distaler Tubulus	Sammelrohr
Positiv	8	25	25	25	25
Negativ	17	0	0	0	0

3.1.2 ZO-1

Der Nachweis von **ZO-1** zeigt eine Färbung, die der von Occludin sehr ähnelt. Es kommt ebenfalls in allen Segmenten des Nephrons zu einer deutlichen Reaktion mit diesem Antikörper. In den Glomerula färben sich neben der Bowman-Kapsel insbesondere die Endothelzellen in den

Gefäßschlingen an. Hier kommt es in allen untersuchten Fällen zu einer stark positiven Reaktion. In 16 der untersuchten Nieren reagieren die proximalen Tubuli schwach mit dem Antikörper gegen ZO-1. Auch alle weiter distal gelegenen Abschnitte des Tubulussystems kommen durch den Nachweis von ZO-1 zur Anfärbung. Das in der Henle-Schleife noch etwas schwer auszumachende TJ-Netzwerk ist im Vergleich in den distalen Tubuli und den Sammelrohren viel deutlicher zu erkennen (Abb. 3.2, Bild C). Die Intensität der Reaktion nimmt hierbei von proximal nach distal zu, so dass sie in den Sammelrohren am stärksten ist. Die Zahl der Fälle mit positiven Färbungen steigt von 17 für die Henle-Schleife über 24 Reaktionen für die distalen Tubuli bis zu einer einheitlichen Färbung der Sammelrohre aller betrachteten Nieren an.

Tabelle 3.3: Expression von ZO-1

	Glomerulum	Proximaler Tubulus	Henle Schleife	Distaler Tubulus	Sammelrohr
Positiv	25	16	17	24	25
Negativ	0	9	8	1	0

3.1.3 Claudin 1

Claudin 1 verhält sich vollkommen anders als die zwei vorangehend untersuchten TJ-Proteine. So kommt es in der Bowman-Kapsel der Glomerula zu einer Reaktion mit dem Claudin-1-spezifischen Antikörper (Abb. 3.3, Bild D). Es kommt zu einer sehr kräftigen Färbung, die teilweise ein TJ-Muster vermuten lässt. Allerdings ist bei der Betrachtung dieses sehr flachen Epithels nicht auszuschließen, dass es auch zu einer Reaktion im Zytoplasma kommt. Alle untersuchten Fälle zeigen diese Reaktion, die bei 24 Patienten mit stark positiv zu bewerten ist. In den proximalen Tubuli, der Henle-Schleife und den Sammelrohren ist Claudin 1 nicht nachweisbar. Auch in den distalen Tubuli sind keine spezifischen Färbungen zu finden. Die sehr schwachen Reaktionen, die in acht Fällen zu sehen sind, sind vermutlich auf eine degenerative Veränderung der entsprechenden Tubuli zurückzuführen. Sie werden daher nicht als positive Ergebnisse in die Auswertung einbezogen. Dieses Färbeverhalten ist nur mit dem Antikörper A (Lot-Nr. 11167698) gegen Claudin 1 zu finden.

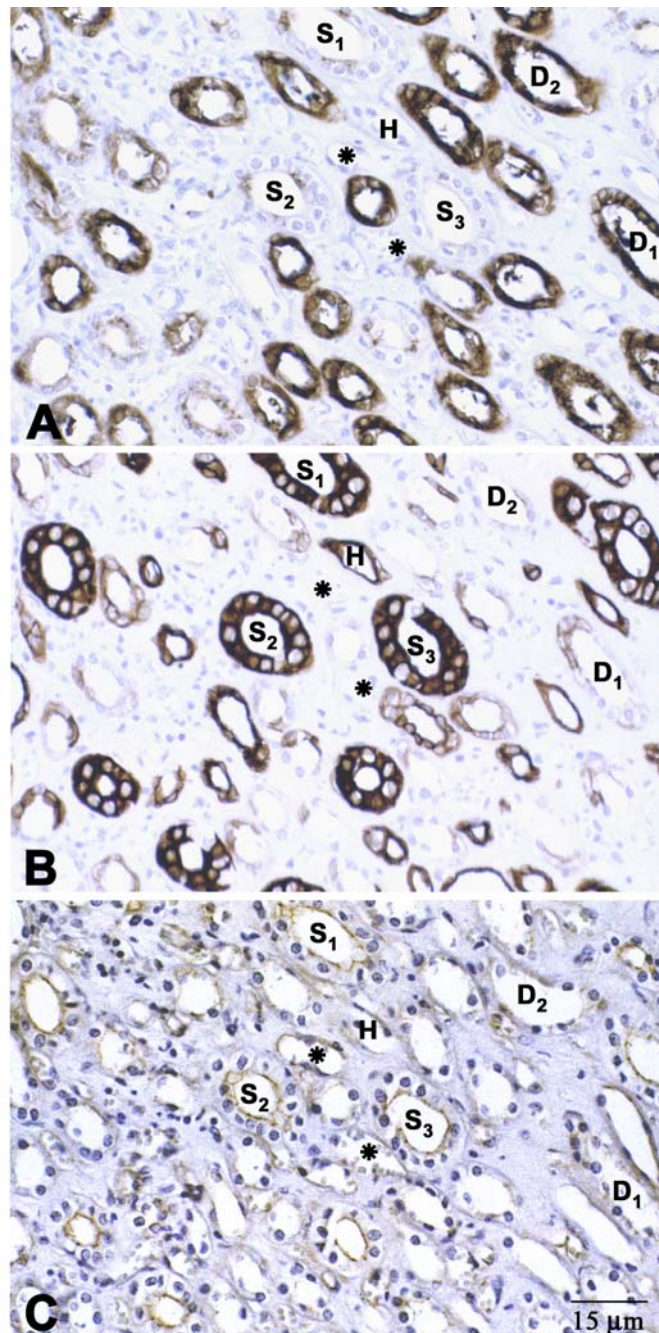


Abbildung 3.2: Immunhistochemische Analysen von **ZO-1 (C)** im distalen Normalnierengewebe (Nierenmark) verglichen mit THP (**A**) und CK 19 (**B**). Es wird die Expression von ZO-1 (**C**) entlang des distalen Nephrons verglichen mit der immunhistochemischen Analyse der für diesen Abschnitt spezifischen Marker THP (**A**) und CK 19 (**B**). THP (**A**) lokalisiert spezifisch in den distalen Tubuli (D₁, D₂), während CK 19 (**B**) in Zellen der Henle-Schleife (H) und denen der Sammelrohre (S₁, S₂, S₃) zu finden ist. ZO-1 (**C**) wird in den TJ von Henle-Schleife (H), distalen Tubuli (D₁, D₂) und Sammelrohren (S₁, S₂, S₃) exprimiert, wo die Reaktion besonders deutlich ausfällt. Hier ist das Netzwerk aus Punkten und zarten Linien im Bereich der apikalen Zellpole klar zu erkennen. Des weiteren sind mit dem Antikörper gegen ZO-1 die TJ in Gefäßendothelien (*) angefärbt. Strichmarke: 15 µm.

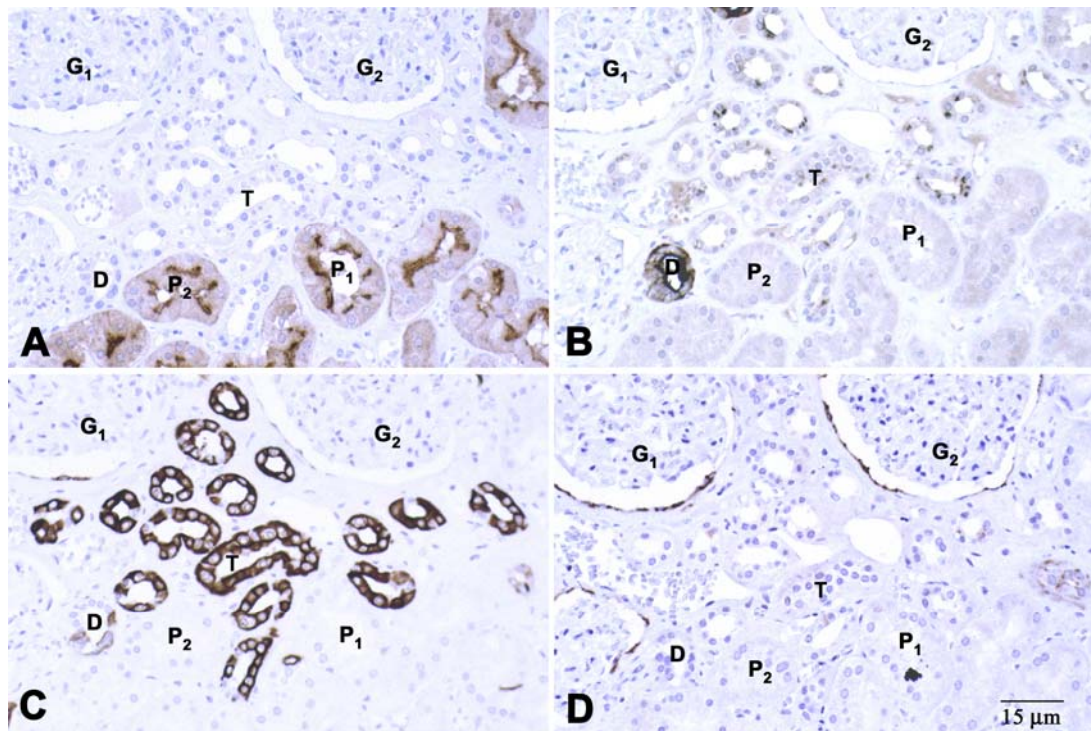


Abbildung 3.3: Immunhistochemische Analysen von **Claudin 1 (D)** in Gegenüberstellung zu Villin (**A**), THP (**B**) und CK 19 (**C**) am Normalnierengewebe (Rinde).

Konsequente Paraffinschnitte von Normalnierengewebe wurden immunhistochemisch mit den segment-spezifischen Markern Villin (**A**), THP (**B**) und CK 19 (**C**) analysiert und mit der immunhistochemischen Analyse der Expression von Claudin 1 (**D**) verglichen. Hierbei kommt Villin (**A**) spezifisch in den Zellen der proximalen Tubuli (P₁, P₂) vor. THP (**B**) färbt Zellen der distalen Tubuli (D). Mit dem Antikörper gegen CK 19 (**C**) käme es normalerweise zu einer Reaktion in den Sammelrohren. In diesem Fall färbt der Antikörper atrophische, vermutlich distale Tubuli (T) (siehe **B**) in einem Fibrosefeld der Rinde. Claudin 1 (**D**) wird ausschließlich im äußeren Blatt der Bowman-Kapsel von Glomerula (G₁, G₂) exprimiert (vergleiche **A**, **B**, **C**, **D**). Strichmarke: 15 µm.

Mit einem anderen von der gleichen Firma bezogenen Antikörper B (Lot-Nr. 1162834) gegen Claudin 1 reagieren außer der Bowman-Kapsel auch die Henle-Schleife, die distalen Tubuli sowie die Sammelrohre. Die zusätzlichen Reaktionen mit dem Antikörper B entsprechen dem Muster von Claudin 3 (siehe unten). Laut Angaben des Herstellers des Serums reagiert dieser Antikörper in der Tat mit dem eng verwandten Claudin 3 kreuz. Dieser Antikörper wird daher in den folgenden Untersuchungen außer Acht gelassen.

Tabelle 3.4: Expression von Claudin 1

	Glomerulum	Proximaler Tubulus	Henle Schleife	Distaler Tubulus	Sammelrohr
Positiv	24	0	0	0	1
Negativ	1	25	25	25	24

In acht Fällen kommt es im distalen Tubulus zu sehr schwachen und unspezifischen Reaktionen, die daher nicht als positive Reaktionen in die Auswertung einbezogen sind.

3.1.4 Claudin 2

Die Verteilung der Reaktionen von **Claudin 2** ist in den einzelnen Nephronabschnitten stark unterschiedlich, wobei bemerkenswerterweise vor allem die proximalen Tubuli positiv sind. Die Bowman-Kapsel färbt sich nur in einigen Glomerula an. Die proximalen Tubuli zeigen hingegen eine sehr einheitliche Färbung (Abb. 3.4, Bild D). Alle untersuchten Nieren lassen Reaktionen erkennen, von denen 13 als stark positiv zu bewerten sind. Bei den angefärbten Strukturen handelt es sich um etwas weniger feine, mehr irreguläre apikale TJ-Reaktionen. Das Maß der Ausprägung ist zu einem großen Teil abhängig vom Erhaltungsgrad der Tubuli. In keinem weiteren Tubulusabschnitt ist Claudin 2 nachweisbar (Abb. 3.4, Bild D). Die beiden verwendeten Antikörper von Zymed bzw. von Prof. Dr. Tsukita weisen weder bezüglich Verteilung noch Intensität Unterschiede auf.

Tabelle 3.5: Expression von Claudin 2

	Glomerulum	Proximaler Tubulus	Henle Schleife	Distaler Tubulus	Sammelrohr
Positiv	15	24	0	0	0
Negativ	10	1	25	25	25

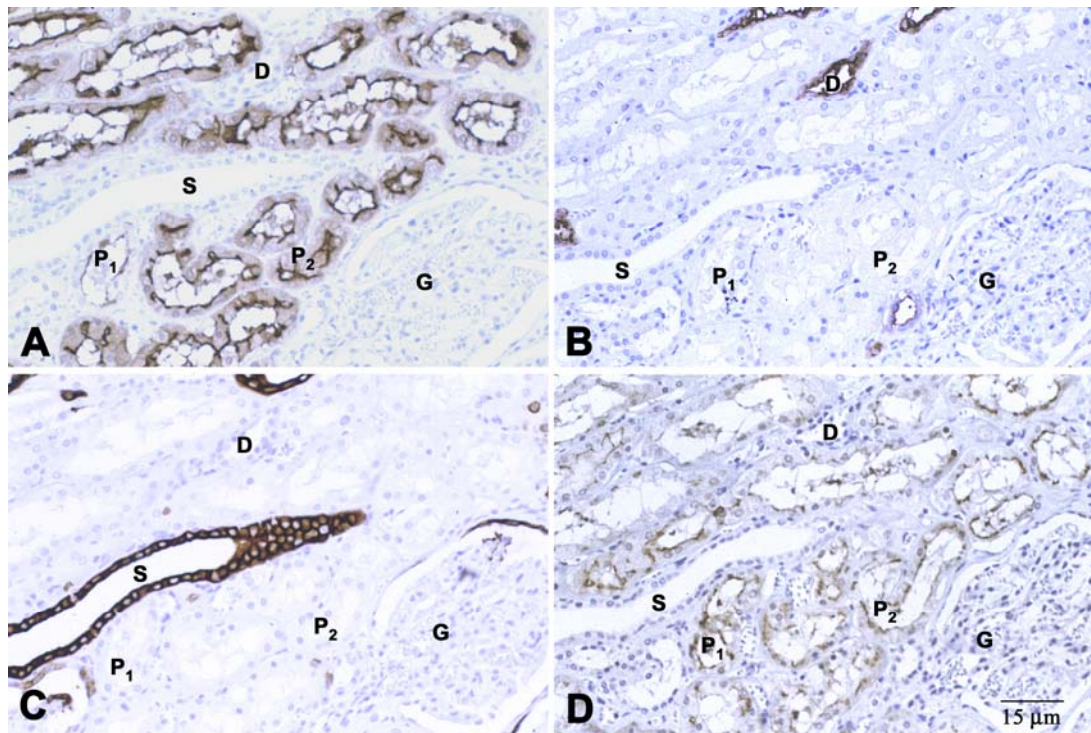


Abbildung 3.4: Immunhistochemische Analysen von **Claudin 2 (D)** in Gegenüberstellung zu Villin (**A**), THP (**B**) und CK 19 (**C**) im Normalnierengewebe (Rinde).

In dieser Abbildung erfolgt die immunhistochemische Analyse der tubulus-spezifischen Marker Villin (**A**), THP (**B**) und CK 19 (**C**). Diese wird mit der immunhistochemischen Analyse der Expression von Claudin 2 (**D**; Zymed) verglichen. Es zeigt sich, dass Villin (**A**) ausschließlich in den proximalen Tubuli (P₁, P₂) nachzuweisen ist, während der Antikörper gegen THP (**B**) spezifisch die Zellen der distalen Tubuli (D) färbt. Der Marker CK 19 (**C**) ist in den Zellen der Sammelrohre (S) lokalisiert. Eine Expression von Claudin 2 (**D**) erfolgt selektiv nur in den proximalen Tubuli (P₁, P₂). Vergleiche dazu Bild **A** und **D**. In den proximalen Tubuli ist ein TJ-Netzwerk zu sehen, das etwas gröber als gewohnt angefärbt ist. Dennoch sind die apikale Lokalisation der TJ sowie zarte Linien, die einzelne, dunklere Punkte miteinander verbinden, zu sehen.

Strichmarke: 15 µm.

3.1.5 Claudin 3

Während Claudin 2 in seiner Expression stark eingegrenzt ist, zeigt **Claudin 3** hingegen wieder eine verbreitete Lokalisation in den TJ entlang des gesamten Nephrons. In allen 25 Fällen sind die Bowman-Kapseln mit dem Antikörper gegen Claudin 3 angefärbt. Auch in den proximalen Tubuli ist in 16 Fällen eine fokale Reaktion nachzuweisen (nicht gezeigt). Diese betrifft nicht die differenzierten proximalen Tubulusepithelien, sondern vor

allem eingestreute, kleine Epithelzellen, die zum Teil auf Duplikaturen der Basalmembran aufsitzen und von unserer Arbeitsgruppe früher bereits als Plica-Zellen charakterisiert worden sind (MOLL ET AL. 1991). In allen untersuchten Nieren zeigt die Henle-Schleife eine schwach positive Reaktion (Abb 3.6, Bild C). Es ist zu erkennen, dass die Färbungen vereinzelt auftreten, und nicht jeder Anschnitt der Henle-Schleife gleichmäßig gefärbt ist. Bei genauer Betrachtung erkennt man, dass in dem sehr flachen Epithel der Henle-Schleife einzelne feine Linien und nicht das honigwabenartige Netzwerk wie in den Sammelrohren zu sehen sind. Hingegen zeigen die distalen Tubuli deutlich in allen untersuchten Fällen ein typisches TJ-Muster mit dem Antikörper gegen Claudin 3 (Abb. 3.6, Bild C). In neun Fällen kann diese Färbung als stark positiv eingestuft werden. Gleichzeitig ist eine diffuse Färbung im Zytoplasma zu erkennen, die gelegentlich zu Überlagerungen mit der Reaktion im membranständigen TJ-Netzwerk führt. Auch die Sammelrohre zeigen entlang ihres gesamten Verlaufs in allen untersuchten Fällen eine stark positive Reaktion auf Claudin 3. Wie in Abb. 3.5 (Bild D) und Abb. 3.6 (Bild C) gezeigt ist, sind TJ kräftig angefärbt, welche die Zellen vollständig umschließen. Die Reaktionen des Antikörpers gegen Claudin 3 von Zymed sind in leicht abgeschwächter Form auch mit dem Antikörper von Prof. Dr.Tsukita nachzuvollziehen. Mit letzterem Antikörper sind in den Glomerula Häufigkeit und Intensität der Farbreaktionen reduziert. Ein Nachweis des Proteins in den proximalen Tubuli ist nur mit dem Antikörper von Zymed zu erreichen; in den distalen Tubuli und den Sammelrohren entsprechen sich allerdings Quantität und Qualität der Reaktionen wieder. Daher ist der kommerzielle Antikörper von Zymed zur Analyse der Expression von Claudin 3 wegen seiner erhöhten Sensitivität besonders geeignet.

Tabelle 3.6: Expression von Claudin 3

	Glomerulum	Proximaler Tubulus	Henle Schleife	Distaler Tubulus	Sammelrohr
Positiv	25	16	25	25	25
Negativ	0	9	0	0	0

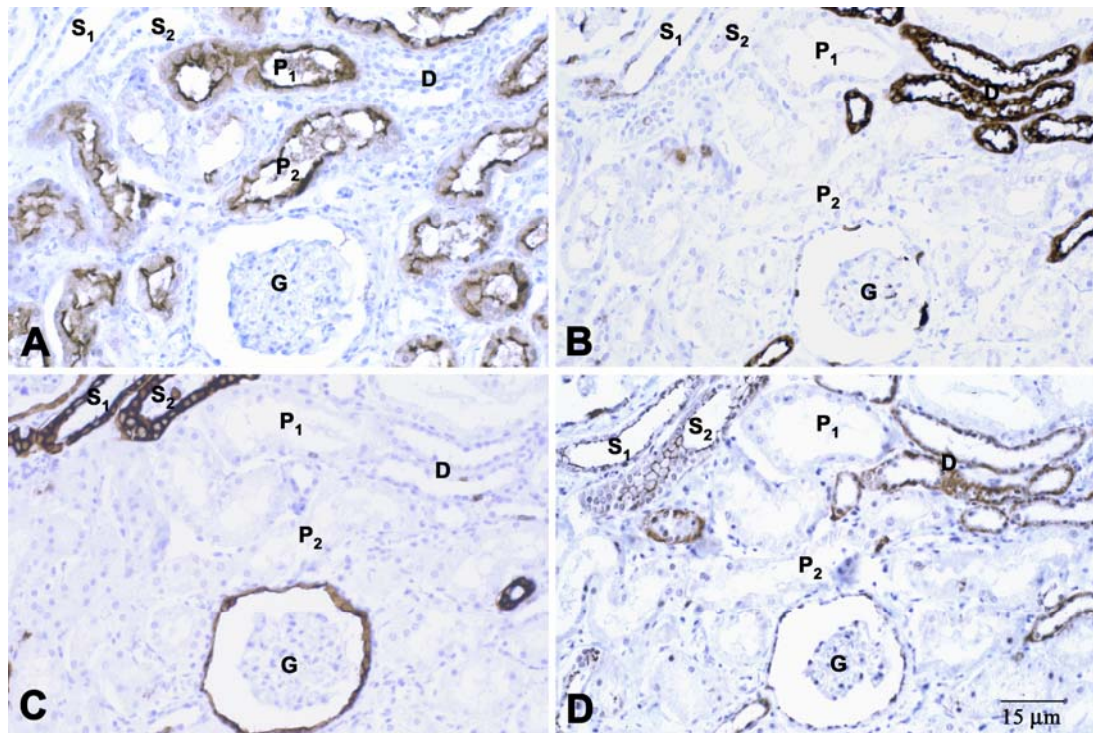


Abbildung 3.5: Immunhistochemische Analysen von **Claudin 3 (D)** im Vergleich zu Villin (A), THP (B) und CK 19 (C) im Normalnierengewebe (Rinde).

Hier werden konsekutive Paraffinschnitte von normalem Nierengewebe mit segment-spezifischen Antikörpern gegen Villin (A), THP (B) und CK 19 (C) mittels Immunhistochemie analysiert und mit der Expression von Claudin 3 (D; Zymed) entlang des Tubulussystems verglichen. Villin (A) lässt sich nur in den proximalen Tubuli (P₁, P₂), THP (B) selektiv in den distalen Tubuli (D) nachweisen. CK 19 (C) kommt in den Zellen der Sammelrohre (S₁, S₂) vor. Claudin 3 (D) wird in den TJ der distalen Tubuli (D) und der Sammelrohre (S₁, S₂) gefunden (vergleiche B, C, D). In den Sammelrohren (S₁, S₂) ist sehr klar das feine TJ-Netzwerk zu erkennen. Die Reaktion in den distalen Tubuli (D) ist vorwiegend zytoplasmatisch und zeigt nur vereinzelt eine Färbung typischer TJ-Strukturen. In anderen untersuchten Nieren kommt es auch in den proximalen Tubuli zu einer Lokalisation von Claudin 3. Dies ist in dem hier vorliegenden Fall nicht gegeben. Die hier dargestellten Reaktionen beziehen sich auf den kommerziell verfügbaren Antikörper. Strichmarke: 15 µm.

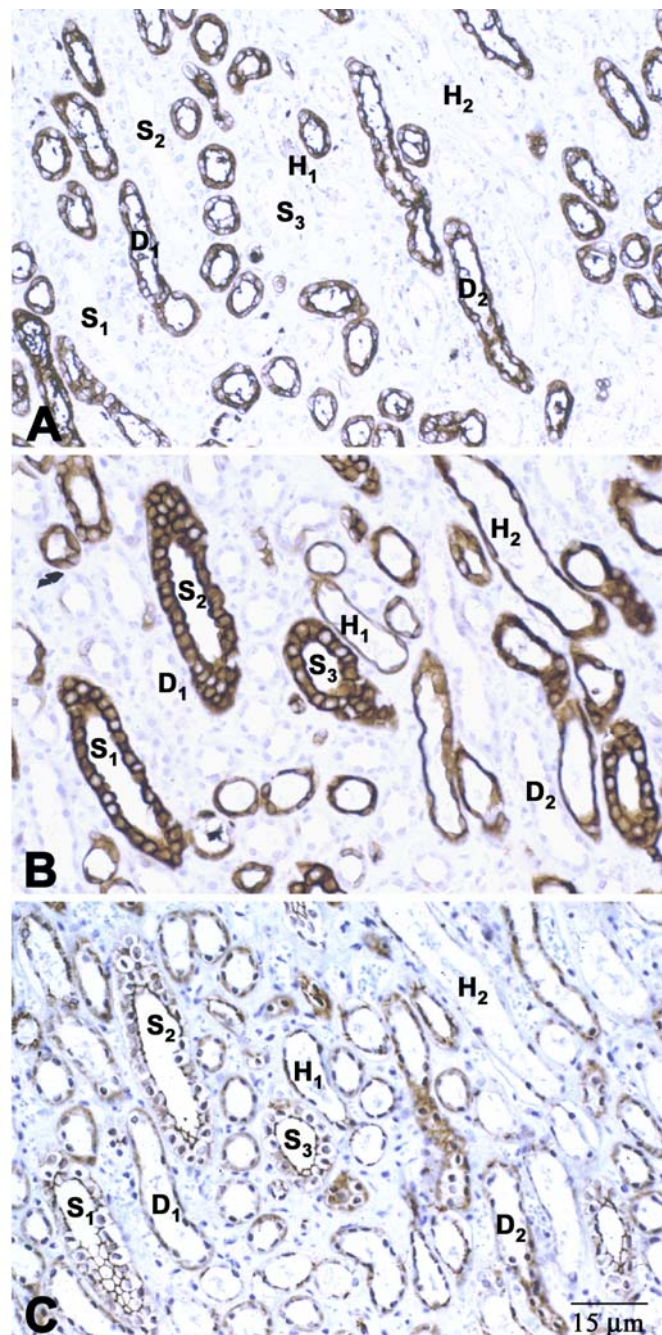


Abbildung 3.6: Immunhistochemische Analysen von **Claudin 3 (C)** im distalen Normalnierengewebe (Mark) im Vergleich zu THP (**A**) und CK 19 (**B**).

In dieser Abbildung wird die immunhistochemische Analyse der spezifisch distalen Marker THP (**A**) und CK 19 (**B**) an konsekutiven Paraffinschnitten mit der Expression von Claudin 3 (**C**; Zymed) in diesen Nephronsegmenten verglichen. Mit dem Antikörper gegen THP (**A**) kommen selektiv die distalen Tubuli (D₁, D₂) zur Darstellung. CK 19 (**B**) kann sowohl in den Sammelrohren (S₁, S₂, S₃) als auch der Henle-Schleife (H₁, H₂) nachgewiesen werden. Aus dem Vergleich der Bilder **A**, **B** und **C** zeigt sich, dass Claudin 3 (**C**) in jedem der genannten Tubulusabschnitte exprimiert wird. So ist in den Sammelrohren (S₁, S₂, S₃) klar das TJ-Muster zu sehen, welches im Tangentialschnitt einem wabenartigen Netz gleicht. In den

distalen Tubuli (D_1 , D_2) ist dieses Netzwerk schlechter zu erkennen, da es zu einer diffusen Reaktion im Zytoplasma der Zellen kommt. In den Abschnitten der Henle-Schleife (H_1 , H_2) wiederum ist in dem flachen Epithel das TJ-Netzwerk gut zu erkennen. Strichmarke: 15 μm .

3.1.6 Claudin 4

Claudin 4 zeigt eine Expression, die besonders in den Sammelrohren ausgeprägt ist. Während sowohl die Glomerula, als auch die proximalen Tubuli und die Henle-Schleife keine Färbung für Claudin 4 aufweisen, reagieren die Sammelrohre in allen Fällen deutlich. In den Sammelrohren kann regelmäßig das klassische TJ-Netzwerk in stark positiver Ausprägung beobachtet werden. In den distalen Tubuli kommt es dagegen zu einer diffusen, vornehmlich basal betonten Färbung des Zytoplasmas, die keine TJ zur Darstellung bringt (Abb 3.7, Bild D und Abb. 3.8, Bild C). Wegen des Ausbleibens einer Reaktion im TJ-Netzwerk wird dieses Färbeverhalten nicht als spezifisch eingestuft. Auch gegen Claudin 4 sind zwei Antikörper verfügbar, die sich in der Verteilung und der Intensität der Reaktionen nicht voneinander unterscheiden. Der eine ist ein monoklonaler Maus-Antikörper (Zymed), der zweite ist ein polyklonales Kaninchen-Serum, das freundlicherweise von Prof. Dr.Tsukita zur Verfügung gestellt wird.

Tabelle 3.7: Expression von Claudin 4

	Glomerulum	Proximaler Tubulus	Henle Schleife	Distaler Tubulus	Sammelrohr
Positiv	1	0	0	0	24
Negativ	24	25	25	25	1

In 19 Fällen kommt es in den distalen Tubuli zu einer Reaktion, die nicht als spezifisch gewertet wird und somit nicht bei den positiven Fällen eingeht.

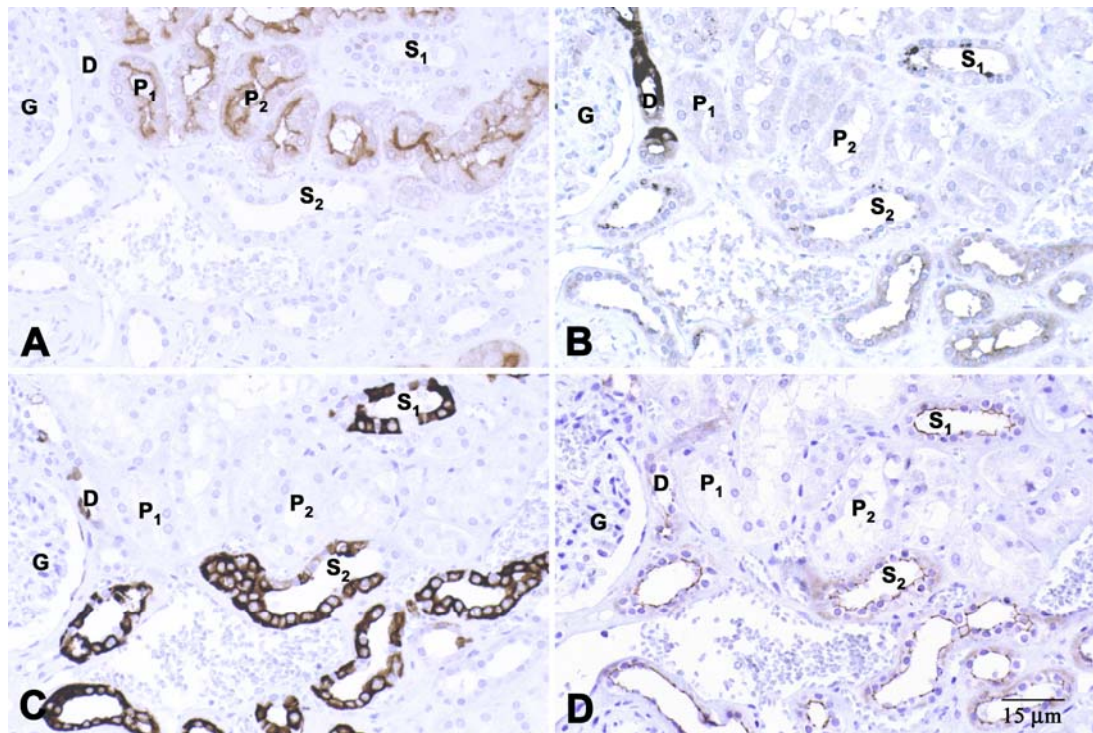


Abbildung 3.7: Immunhistochemische Analysen von **Claudin 4 (D)** im Vergleich zu Villin (**A**), THP (**B**) und CK 19 (**C**) im Normalnierengewebe (Rinde).

Konsequente Paraffinschnitte von Normalnierengewebe werden immunhistochemisch mit den segment-spezifischen Markern Villin (**A**), THP (**B**) und CK 19 (**C**) analysiert und mit der immunhistochemischen Analyse von Claudin 4 (**D**; monoklonaler Antikörper) verglichen. Dabei ist Villin (**A**) selektiv in den proximalen Tubuli (P₁, P₂) zu finden, und der Antikörper gegen THP (**B**) bringt die distalen Tubuli (D) zur Darstellung. CK 19 (**C**) kommt in den Zellen der Sammelrohre (S₁, S₂) vor. Claudin 4 (**D**) hingegen wird spezifisch nur in den Sammelrohren (S₁, S₂) exprimiert (vergleiche **C** und **D**). Hier stellt sich ein feines TJ-Netzwerk entlang der apikalen Zellpole dar. In Glomerula (G), proximalen Tubuli (P₁, P₂) und den distalen Tubuli (D) kommt es nicht zur spezifischen Reaktion mit dem Antikörper gegen Claudin 4.

Strichmarke: 15 µm.

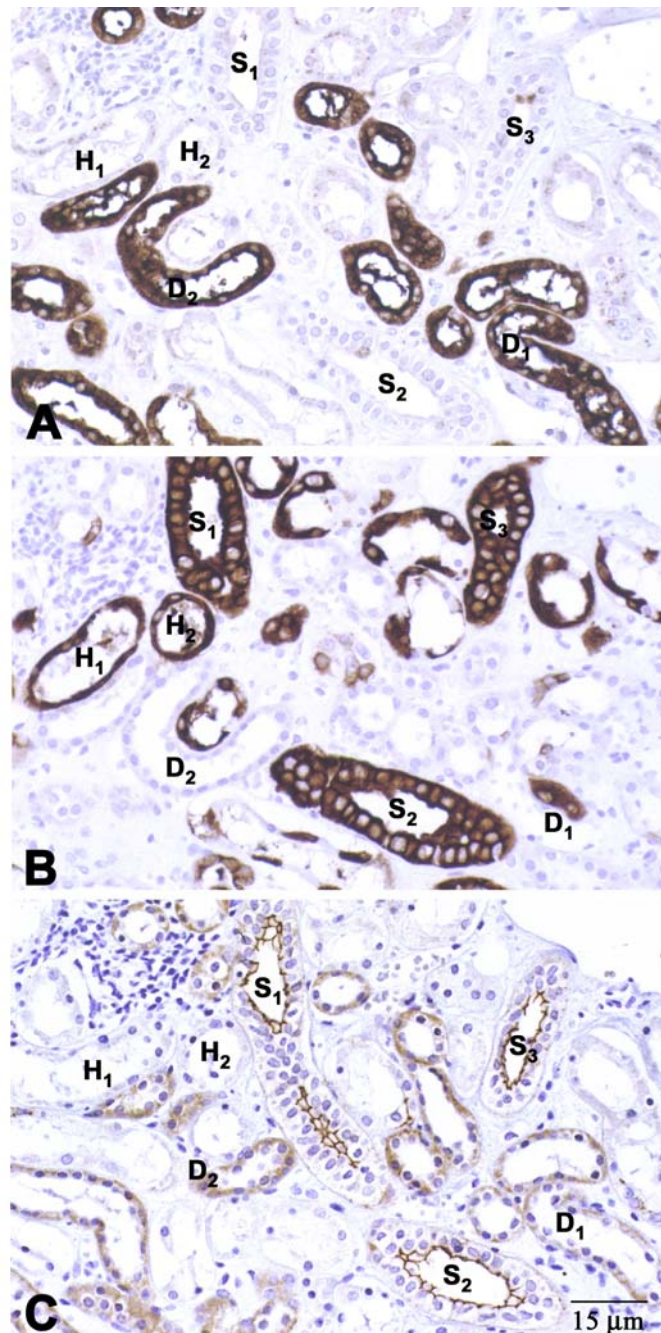


Abbildung 3.8: Immunhistochemische Analysen von **Claudin 4 (C)** im distalen Normalnierengewebe (Mark) verglichen mit THP (**A**) und CK 19 (**B**). Hier wird die immunhistochemische Analyse an konsekutiven Paraffinschnitten mit den spezifischen distalen Markern THP (**A**) und CK 19 (**B**) dargestellt. Diese wird dann mit der spezifischen Expression von Claudin 4 (**C**; monoklonaler Antikörper) in diesen Nephronsegmenten verglichen. Während THP (**A**) selektiv in den Zellen der distalen Tubuli (D₁, D₂) lokalisiert ist, kommt CK 19 (**B**) sowohl im Epithel von Henle-Schleife (H₁, H₂) als auch in dem der Sammelrohre (S₁, S₂, S₃) vor. Claudin 4 (**C**) lässt eine Verteilung erkennen, die auf die Sammelrohre (S₁, S₂, S₃) begrenzt ist (vergleiche **B** und **C**). Die feinen Linien des TJ-Netzwerkes sind hier besonders deutlich zu erkennen. In den distalen Tubuli (D₁, D₂) ist nur eine diffuse Färbung des Zytoplasmas zu sehen, wobei keine TJ zur Darstellung

kommen. Daher wird diese Reaktion nicht als spezifisch gewertet. In der Henle-Schleife (H_1 , H_2) ist ebenfalls keine Expression von Claudin 4 zu verzeichnen.

Strichmarke: 15 μm .

3.1.7 Claudin 8

Claudin 8 wird fast ausschließlich in den Zellen der Sammelrohre exprimiert. Lediglich in drei Fällen kommt es in den distalen Tubuli zu einer schwachen Reaktion mit diesem Antikörper. Wie in Abb. 3.9 (Bild D) und Abb. 3.10 (Bild C) dargestellt ist, kann man die TJ der Sammelrohre deutlich erkennen, während alle anderen Nephronsegmente ungefärbt bleiben. In 20 der analysierten Nierengewebe ist die Reaktion mit stark positiv zu bewerten.

Tabelle 3.8: Expression von Claudin 8

	Glomerulum	Proximaler Tubulus	Henle Schleife	Distaler Tubulus	Sammelrohr
Positiv	0	0	0	3	24
Negativ	25	25	25	22	1

3.1.8 Claudin 11

Ein ebenfalls distal betontes, aber besonderes Bild bietet sich bei dem Nachweis von **Claudin 11**. Es wird vorherrschend in den Zellen der distalen Tubuli exprimiert. Dem gegenüber sind in den untersuchten Nieren vom Glomerulum bis zur Henle-Schleife keine Anfärbungen der TJ zu verzeichnen (Abb. 3.11, Bild D und Abb. 3.12, Bild C). In fast allen analysierten Nieren kommt es in den distalen Tubuli zur Reaktion des Claudin-11-spezifischen Antikörpers, die das feine TJ-Netzwerk erkennen lässt und in 14 Fällen als stark positiv eingestuft wird. Die Ausprägung der TJ des relativ flachen Epithels ist aber weniger wabenartig wie in den Sammelrohren, sondern eher als punktförmig mit einzelnen zarten Linien zu bezeichnen (Abb. 3.11 und Abb. 3.12, Bilder C und D). In gleicher Weise galt dies schon bei der Betrachtung der Henle-Schleife mit Claudin 3. Bei lediglich vier der Gewebeproben kommt es zu einer schwachen Reaktion in

den Sammelrohren. Da diese Färbung inkonsistent und vereinzelt ist, liegt nahe, dass die Sammelrohre kein Claudin 11 exprimieren. In Abb. 3.11 (Bild D) ist in allen Anschnitten der Sammelrohre keine Reaktion des Antikörpers gegen Claudin 11 festzustellen. In der folgenden Abb. 3.12 (Bild C) kann man in einigen Anschnitten von Sammelrohren eine Färbung erkennen. Diese liegt zu einem großen Teil diffus intrazellulär. Die Reaktion wird daher nicht als spezifisch eingestuft.

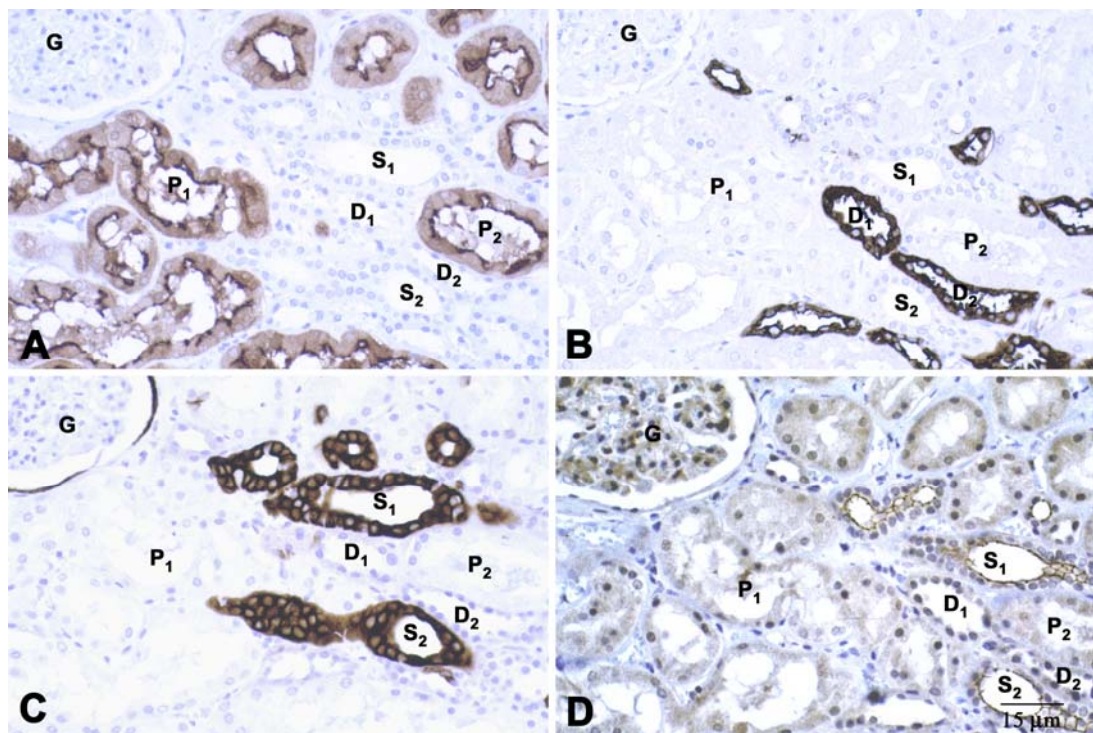


Abbildung 3.9: Immunhistochemische Analysen von **Claudin 8 (D)** am Normalnierengewebe (Rinde) verglichen mit Villin (A), THP (B) und CK 19 (C).

Verglichen wird hier die immunhistochemische Analyse der segment-spezifischen Marker Villin (A), THP (B) und CK 19 (C) an konsekutiven Paraffinschnitten mit der ebenfalls immunhistochemischen Analyse der spezifischen Expression von Claudin 8 (D). Villin (A) ist ausschließlich in den proximalen Tubuli (P₁, P₂) nachzuweisen. THP (B) lokalisiert in den distalen Tubuli (D₁, D₂) und CK 19 (C) in den Zellen der Sammelrohre (S₁, S₂). Claudin 8 (D) hingegen zeigt eine spezifische Expression in den TJ des Sammelrohrepithels (S₁, S₂). Vergleiche dazu Bild C und D. Hier kommt an den apikalen Zellgrenzen das zarte TJ-Netzwerk zur Darstellung, das die Zellen im Tangentialschnitt wabenartig umgibt. In den Glomerula (G), den proximalen (P₁, P₂) und distalen Tubuli (D₁, D₂) liegt keine Expression von Claudin 8 vor.

Strichmarke: 15 µm.

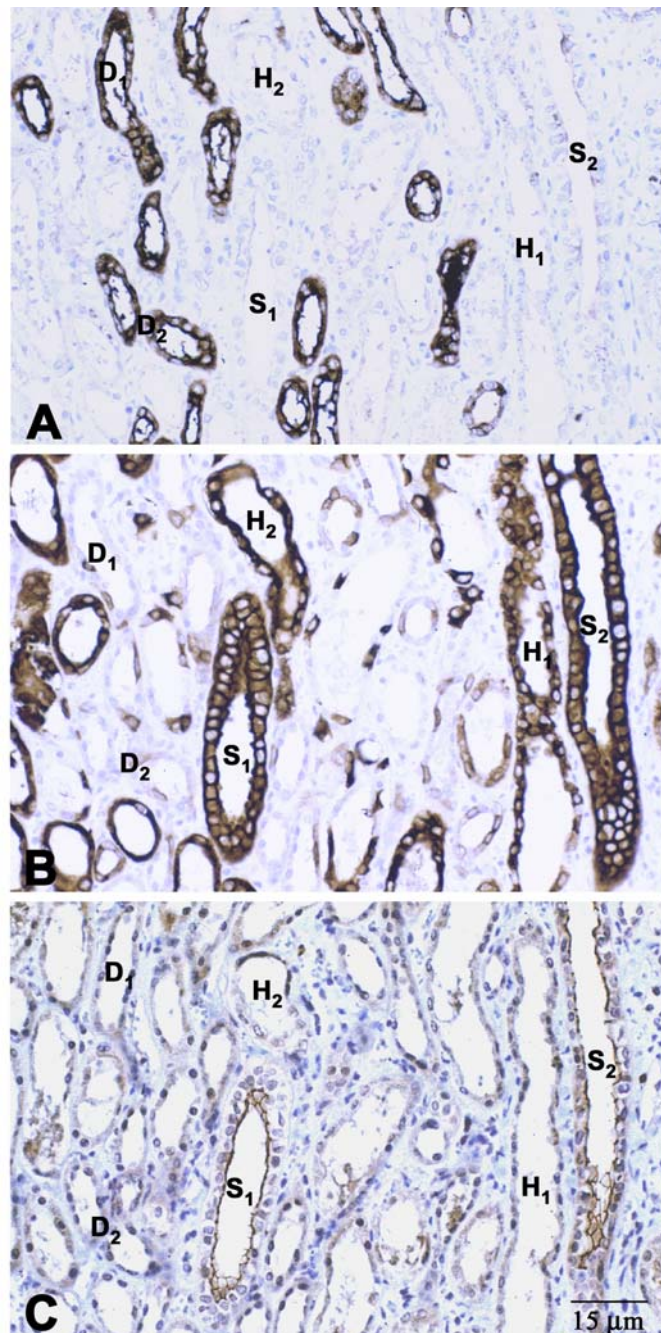


Abbildung 3.10: Immunhistochemische Analysen von **Claudin 8 (C)** im distalen Normalnierengewebe (Mark) verglichen mit THP (**A**) und CK 19 (**B**). Serienparaffinschnitte von Normalnierengewebe wurden mittels Immunhistochemie mit den spezifisch distalen Markern THP (**A**) und CK 19 (**B**) analysiert und anschließend mit der Expression von Claudin 8 (**C**) in diesen Nephronsegmenten verglichen. THP (**A**) kommt ausschließlich in den distalen Tubuli (D₁, D₂) vor. Der Antikörper gegen CK 19 (**B**) hingegen bringt Henle-Schleifen (H₁, H₂) und Sammelrohre (S₁, S₂) zur Darstellung. Eine Expression von Claudin 8 (**C**) erfolgt lediglich in den Zellen der Sammelrohre (S₁, S₂). In deren luminalen Zellgrenzen ist deutlich das feine Netzwerk der TJ zu erkennen (vergleiche **B** und **C**). In den distalen Tubuli (D₁, D₂) und der Henle-Schleife (H₁, H₂) ist kein Claudin 8 nachzuweisen. Strichmarke: 15 µm.

Tabelle 3.9: Expression von Claudin 11

	Glomerulum	Proximaler Tubulus	Henle Schleife	Distaler Tubulus	Sammelrohr
Positiv	0	0	0	24	0
Negativ	25	25	25	1	25

In 4 Fällen kommt es in den Sammelrohren zu einer schwachen, unspezifischen Reaktion, die hier nicht als positiv gewertet wird.

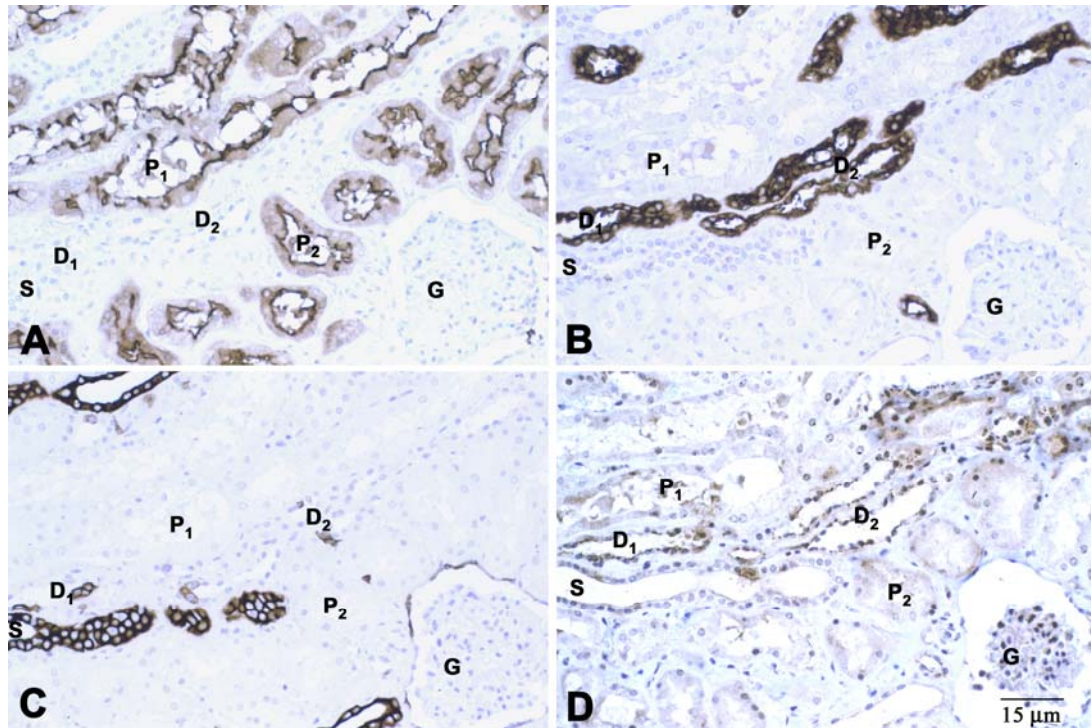


Abbildung 3.11: Immunhistochemische Analysen mit **Claudin 11 (D)** am Normalnierengewebe (Rinde) im Vergleich mit Villin (**A**), THP (**B**) und CK 19 (**C**).

Konsekutivschnitte von in Paraffin eingebettetem normalen Nierengewebe wurden immunhistochemisch mit den segment-spezifischen Markern Villin (**A**), THP (**B**) und CK 19 (**C**) analysiert. Anschließend werden die Ergebnisse mit der immunhistochemischen Analyse der selektiven Expression von Claudin 11 (**D**) entlang des Tubulussystems verglichen. Während Villin (**A**) ausschließlich in den Zellen der proximalen Tubuli (P₁, P₂) nachzuweisen ist, färbt der Antikörper gegen THP (**B**) die distalen Tubuli (D₁, D₂). CK 19 (**C**) hingegen ist in den Sammelrohren (S) zu finden. Claudin 11 (**D**) wird ausnahmslos in den Zellen der distalen Tubuli (D₁, D₂) exprimiert. In deren Epithel ist ganz zart das feine TJ-Muster an den luminalen Zellpolen zu erkennen (vergleiche **B** und **D**). In Glomerula (G), proximalen Tubuli (P₁, P₂) und den Sammelrohren (S) wird kein Claudin 11 exprimiert. Strichmarke: 15 µm.

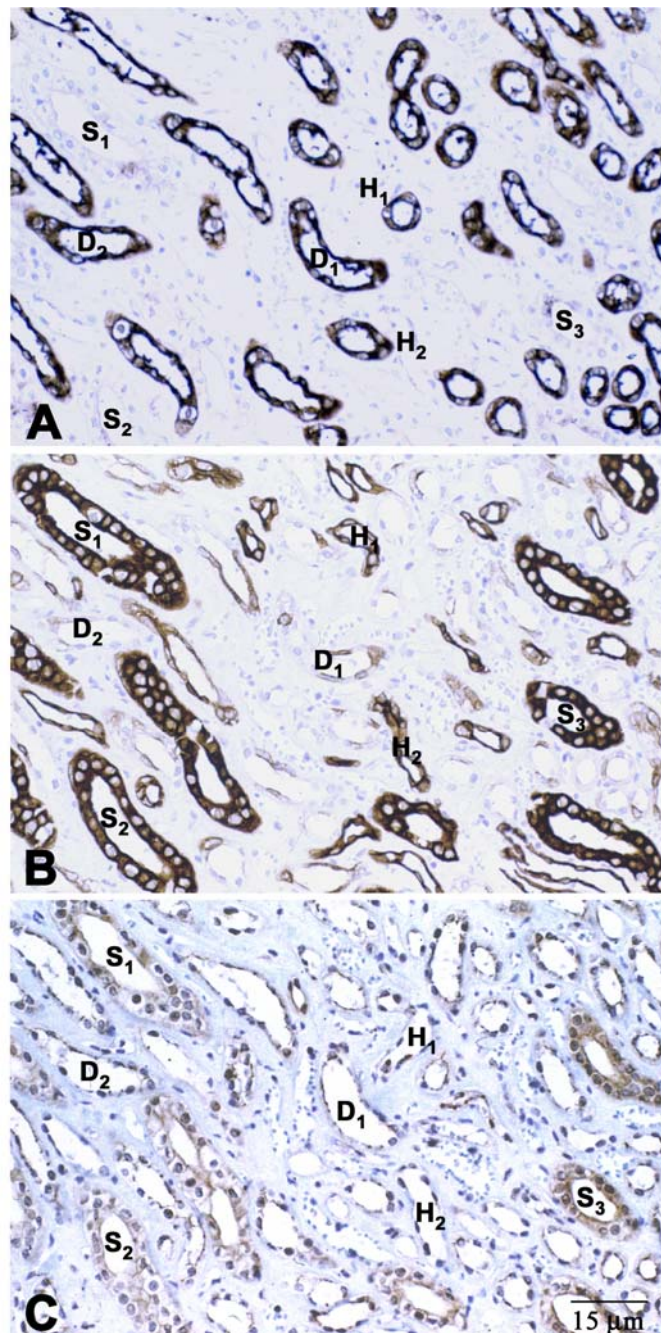


Abbildung 3.12: Immunhistochemische Analysen mit **Claudin 11 (C)** im distalen Normalnierengewebe (Mark) im Vergleich mit THP (**A**) und CK 19 (**B**).

Hier ist der Vergleich der immunhistochemischen Analyse der spezifisch distalen Marker THP (**A**) und CK 19 (**B**) an konsekutiven Paraffinschnitten mit der immunhistochemischen Analyse der Expression von Claudin 11 (**C**) in distalen Nephronsegmenten dargestellt. Der Antikörper gegen THP (**A**) bringt selektiv die distalen Tubuli (D₁, D₂) zur Darstellung. CK 19 (**B**) ist sowohl in den Zellen der Henle-Schleife (H₁, H₂) als auch in denen der Sammelrohre (S₁, S₂, S₃) zu finden. Claudin 11 (**C**) zeigt auch hier eine selektive Lokalisation in den TJ der distalen Tubuli (D₁, D₂). Sehr dezent sind hier die feinen TJ-Muster zu sehen (vergleiche **A** und **C**). Auch in den Sammelrohren (S₁, S₂, S₃), die in der vorangehenden Abbildung nicht

reagiert haben, sind vereinzelt TJ zu erkennen. Es ist daher nicht klar, ob es sich um eine spezifische Expression handelt, zumal eine diffuse zytoplasmatische Färbung die Beurteilung erschwert. In der Henle-Schleife (H_1 , H_2) ist keine Anreicherung von Claudin 11 in den TJ nachzuweisen. Strichmarke: 15 μm .

3.1.9 Zusammenfassung

Die Expression der TJ-Proteine lässt sich wie folgt zusammenfassen. Sowohl das Transmembranprotein Occludin, als auch das cytoplasmatisch lokalisierte Protein ZO-1 werden entlang des gesamten Nephrons nachgewiesen. Differenziell exprimiert werden hingegen die Claudine. So werden im Bereich der Bowman-Kapsel der Glomerula Claudin 1, Claudin 2 und Claudin 3 gefunden. In den proximalen Tubuli werden Claudin 2 und Claudin 3 exprimiert. In den TJ der Henle-Schleife lokalisiert lediglich Claudin 3. In den distalen Tubuli ist eine Expression von Claudin 3 und Claudin 11 festzustellen. Für das Sammelrohr erfolgt der Nachweis von Claudin 3, Claudin 4 und Claudin 8. Diese unterschiedlichen Expressionsmuster entlang der einzelnen Segmente des Nephrons können schematisch der Abbildung 3.13 entnommen werden.

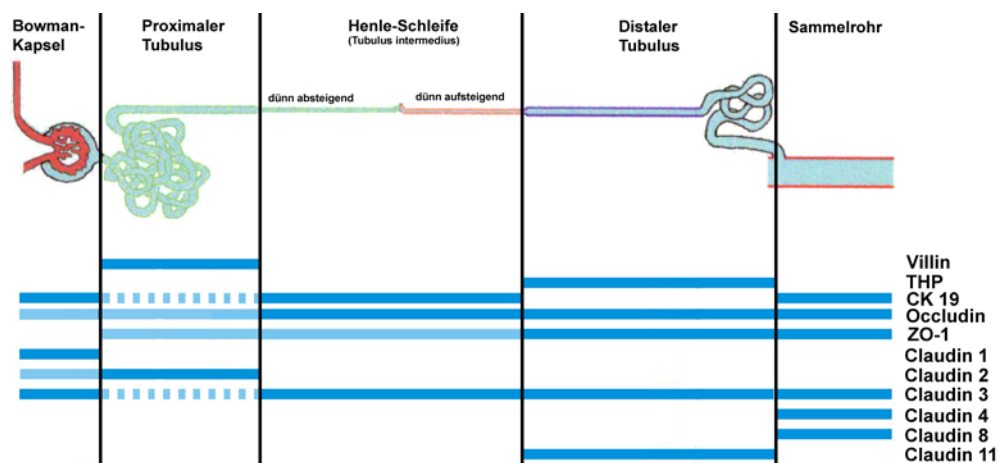


Abbildung 3.13: Schematische Darstellung der Antikörperreaktionen entlang des Tubulussystems im Normalnierengewebe

3.2 Immunhistochemische Befunde im klarzelligen Nierenzellkarzinom

3.2.1 Occludin

Der Nachweis von **Occludin** fällt bei allen elf analysierten klarzelligen Nierenzellkarzinomen negativ aus. Lediglich bei einem der analysierten Karzinome kommt es zu einer regional begrenzten und schwachen Färbung. Diese findet sich ausschließlich in direkter Nähe zur Tumorkapsel. Vermutlich rührt diese Reaktion von noch erhaltenen, durch den Tumor komprimierten Tubuli her. Das Fehlen von Occludin ist insofern erstaunlich, da Occludin somit ausschließlich in diesem Typ des Nierenzellkarzinoms keine Expression aufweist. Das Fehlen der Occludin-Reaktion ist in Abb. 3.14 (Bild A) gezeigt.

3.2.2 ZO-1

Auch mit **ZO-1** ist keine Färbung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms zu verzeichnen. In sieben der elf betrachteten Karzinome ist kein Nachweis dieses intrazellulären TJ-Proteins möglich. Die beobachteten Reaktionen in den übrigen vier Fällen sind sehr zart und teilweise nicht von Färbungen der TJ im Gefäßendothel zu trennen. Diese Reaktion wird daher für die Tumorzellen als nicht spezifisch interpretiert (Abb. 3.14, Bild B).

3.2.3 Claudin 1

Auch beim Nachweis von **Claudin 1** ist mit dem Antikörper A keine spezifische Reaktion zu erzielen (Abb. 3.14, Bild C). In neun der Tumoren ist keine eindeutige Färbung zu erkennen. Da die bei zwei Tumoren auftretenden Reaktionen wiederum in Randbereichen des Tumors oder in der Nähe von zystischen Veränderungen liegen, ist, analog zur Occludinreaktion, davon auszugehen, dass es sich um keine tumorzellbezogene Reaktion handelt. Die Reaktionen mit dem Antikörper B

dürften, wie oben aufgeführt, auf eine Kreuzreaktion mit Claudin 3 zurückzuführen sein (Abb. 3.14, Bild D).

3.2.4 Claudin 2

Eine sehr deutliche Expression im klarzelligen Nierenzellkarzinom weist **Claudin 2** auf. Hier kommt es mit einer Ausnahme in den analysierten Fällen dieses Tumortyps zu einer positiven Reaktion (Abb. 3.14, Bild E). Bei einer der Gewebeproben des klarzelligen Nierenzellkarzinoms ist die Reaktion sogar als stark positiv zu bewerten. Die Tumoren lassen mit den beiden spezifischen Antikörpern gegen Claudin 2 ein Muster erkennen, das dem schon aus dem Normalnierengewebe bekannten Netzwerk der TJ entspricht. So sind auch im klarzelligen Nierenzellkarzinom die zarten Linien zu sehen, welche die Zellen in tangential getroffenen Stellen rundherum umgeben (Abb. 3.14, Bild E). Diese lineare TJ-Reaktion ist bei tubulären Tumorstrukturen an den apikalen Zellpolen zu finden. Bei soliden Tumorzellnestern ist das Muster in zentralen, den apikalen Zellpolen äquivalenten Tumorzellabschnitten, durch welche rudimentäre Lumina angezeigt werden, lokalisiert. Die Claudin-2-Reaktion ist somit stets fokal ausgebildet.

3.2.5 Claudin 3

In der Mehrzahl der klarzelligen Nierenzellkarzinome findet sich keine Expression von **Claudin 3**. In acht Tumoren gelingt der Nachweis dieses Proteins nicht. Nur in drei der betrachteten Fälle kommt es zu einer Farbreaktion. Einer von diesen ist in der Abb. 3.14 (Bild F) dargestellt. Hier ist zu erkennen, dass die angefärbte Struktur deutlich das klassische TJ-Netzwerk erkennen lässt, welches in diesem Falle in Tumorzellen, die tubuläre und zystische Strukturen ausbilden, lokalisiert ist (Sterne). Somit ergibt sich bei der Gruppe der klarzelligen Nierenzellkarzinome eine heterogene Expression von Claudin 3. Bei der Färbung des klarzelligen Nierenzellkarzinoms unterscheiden sich die zwei verwendeten Antikörper gegen Claudin 3 (von Zymed beziehungsweise Prof. Dr. Tsukita) etwas. Mit dem Antikörper von Zymed finden sich in drei, bei dem anderen Antikörper bei nur einem Fall Reaktionen. Allerdings färben beide Antikörper mit

gleicher Intensität den in der Abb. 3.14 exemplarisch dargestellten Tumor. Es ist also, wie schon bei der Analyse des Normalnierengewebes, zu vermuten, dass der Antikörper von Zymed sensibler reagiert und sich daher besser zur Beurteilung der Expression von Claudin 3 eignet. Somit können drei von elf klarzelligen Nierenzellkarzinomen als Claudin 3-positiv angesehen werden.

3.2.6 Claudin 4

Im Fall von **Claudin 4** ist im klarzelligen Nierenzellkarzinom keine spezifische Färbung zu verzeichnen (Abb. 3.15, Bild A). Nur in einem der untersuchten Tumoren kommt es zu einer schwach positiven, vermutlich spezifischen Reaktion. Vergleicht man die verwendeten Antikörper, so weisen der monoklonale und der polyklonale Antikörper keinerlei Unterschiede in ihrem Reaktionsverhalten auf.

3.2.7 Claudin 8

Ein vergleichbares Ergebnis ist auch bei der Analyse der Expression von **Claudin 8** zu erhalten. Keiner der untersuchten Tumoren zeigt eine spezifische Färbung mit dem Antikörper gegen dieses Protein (Abb. 3.15, Bild B). Somit liegt nahe, dass in den TJ des klarzelligen Nierenzellkarzinoms kein Claudin 8 lokalisiert ist.

3.2.8 Claudin 11

Ein identisches Ergebnis liefert die Analyse der Verteilung von **Claudin 11**. In keinem der betrachteten klarzelligen Nierenzellkarzinome kommt es zu einer Reaktion (Bildtafel 3.15, Bild C). Dies führt zu dem Schluss, dass im Nierenzellkarzinom des klarzelligen Typs kein Claudin 11 gebildet wird.

3.2.9 Vergleich zum normalen Nephron

In den klarzelligen Nierenzellkarzinomen wird aus der Familie der Claudine nahezu ausschließlich Claudin 2 gebildet. Dies entspricht dem Befund im normalen Nierengewebe, wo Claudin 2 selektiv im proximalen Tubulus exprimiert wird und somit als Marker-Protein für diesen Nephronabschnitt angenommen werden kann. Das seltene Vorkommen von

Claudin 3 in klarzelligen Nierenzellkarzinomen korreliert jedoch nicht mit den proximalen Tubuluszellen und könnte allenfalls mit Reaktionen in Plica-Zellen in Verbindung gebracht werden.

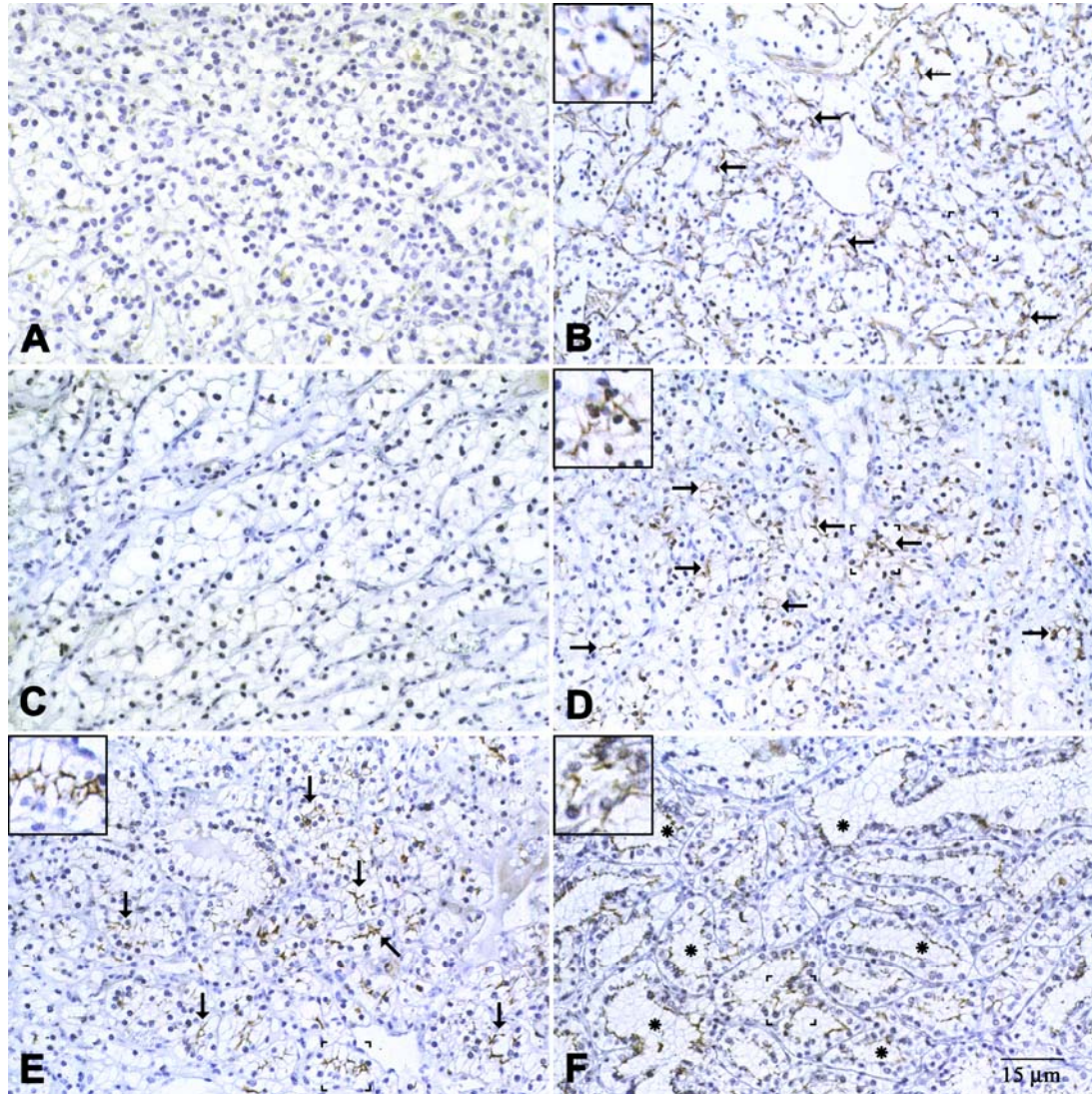


Abbildung 3.14: Immunhistochemische Analysen von Occludin (A), ZO-1 (B), Claudin 1 (C, D), Claudin 2 (E) und Claudin 3 (F) am **klarzelligen Nierenzellkarzinom**.

Mit Hilfe der Immunhistochemie an Paraffinschnitten von klarzelligen Nierenzellkarzinomen wird die Expression verschiedener TJ-Proteine in diesen Karzinomen analysiert und miteinander verglichen. Occludin (A) ist in diesem Karzinom nicht nachzuweisen. Der Antikörper gegen ZO-1 (B) zeigt nicht das bekannte Verteilungsmuster. Außerdem ist die Reaktion schwerer zu erkennen als gewohnt. Sie wird daher mit Pfeilen (→) markiert. Diese Färbung wird nicht für spezifisch gehalten (siehe Text). Der Antikörper (Lot-Nr. 11167698) gegen Claudin 1 (C) bringt keine TJ zur Darstellung, während mit dem Antikörper (Lot-Nr. 01162834) gegen Claudin 1 (D) Reaktionen in den TJ zu verzeichnen sind (→). Da dieses Serum nach Herstellerangaben vermutlich mit Claudin 3 kreuzreagiert, werden diese Reaktionen nicht als spezifisch angesehen und nicht in die Auswertung einbezogen. Claudin 2

(E; Zymed) wird in den klarzelligen Karzinomen eindeutig exprimiert. Es stellt sich ein fokal ausgebildetes, wabenartiges Netzwerk (→) dar. Auch Claudin 3 (F; Zymed) lässt das TJ-Verteilungsmuster in Form eines Netzwerkes erkennen. Diese Reaktionen sind sehr stark luminal betont (*). Die Inserts oben links in den Bildern (B, D, E und F) zeigen typische Reaktionen in zweifacher Vergrößerung des Ausgangsbildes. Der vergrößerte Ausschnitt entstammt dem markierten Feld. Strichmarke: 15 µm.

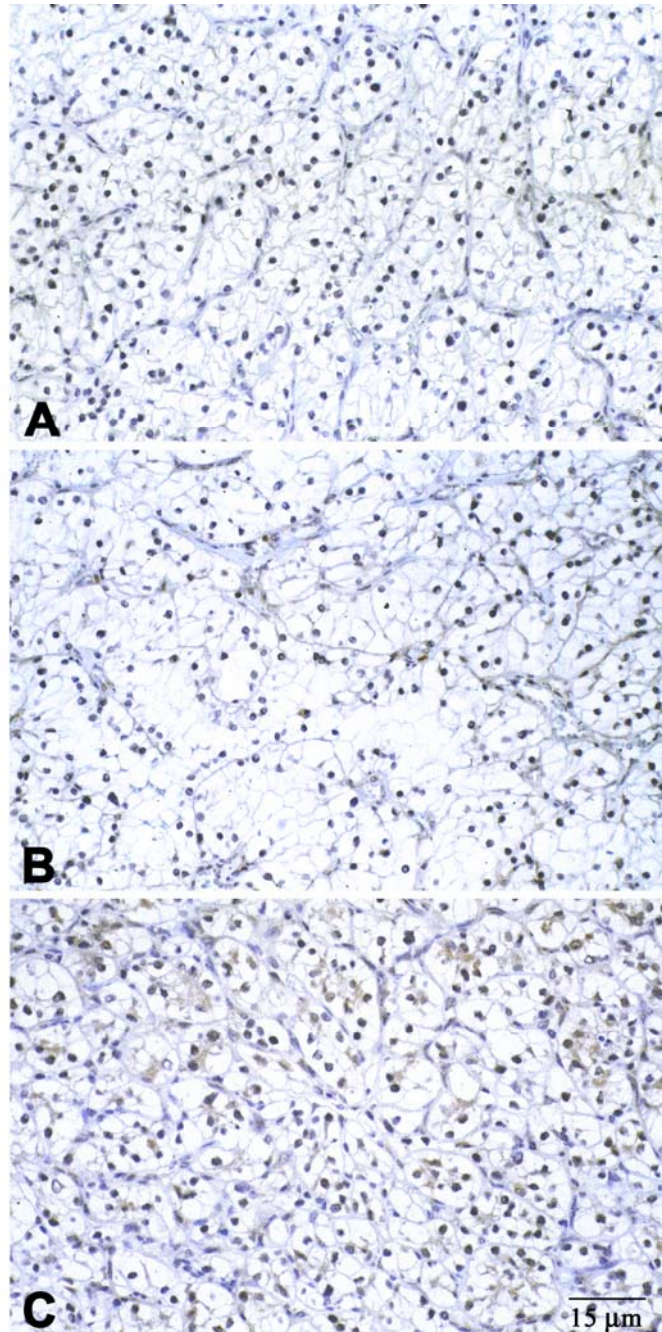


Abbildung 3.15: Immunhistochemische Analysen von Claudin 4 (A), Claudin 8 (B) und Claudin 11 (C) am **klarzelligen Nierenzellkarzinom**. Es wird mittels Immunhistochemie an Paraffinschnitten von klarzelligen Nierenzellkarzinomen die Expression von drei verschiedenen TJ-Markern analysiert. Claudin 4 (A; monoklonaler Antikörper) ist in diesem Karzinom

nicht nachzuweisen. Ebenso ist keine Expression von Claudin 8 (**B**) festzustellen. Auch Claudin 11 (**C**) wird in den klarzelligen Nierenzellkarzinomen nicht gebildet.

Strichmarke: 15 µm.

3.3 Immunhistochemische Befunde im papillären Nierenzellkarzinom

Insgesamt gestaltet sich die Bewertung der Reaktionen in den papillären Nierenzellkarzinomen schwieriger als bei den anderen Karzinomtypen. Dies liegt zum einen daran, dass die klassischen TJ-Muster in den einzelnen Papillen nicht sehr regelmäßig ausgeprägt sind, zum anderen daran, dass der Erhalt deutlicher Zellgrenzen im Bereich der Papillen nicht immer gegeben ist. Außerdem kommt es in diesen Karzinomen sehr häufig zu Einblutungen, und Ablagerungen von Hämosiderin (Abb. 3.17, Bild B) überlagern oftmals die erwarteten Färbemuster der feinen TJ-Strukturen. Dennoch lassen sich hinreichend sichere Aussagen treffen.

3.3.1 Occludin

Bei der Analyse der Expression von **Occludin** reagieren alle zehn untersuchten papillären Karzinome regelmäßig positiv mit dem spezifischen Antikörper. Die Reaktionen sind trotz einer leichten diffusen Färbung des Zytoplasmas deutlich zu sehen. Bei genauer Betrachtung lässt sich das gewohnte Bild von feinen interzellulären Netzwerken an den apikalen Zellseiten sehen (Abb. 3.16, Bild A, Pfeile). Die Färbung ist gleichförmig über die gesamten Tumorpapillen entlang der dem Lumen zugewandten Oberfläche ausgebildet.

3.3.2 ZO-1

Auch für **ZO-1** ist dieser Typ des Nierenzellkarzinoms mit dem spezifischen Antikörper bis auf eine Ausnahme konstant positiv gefärbt. Hinsichtlich der papillären Tumorstrukturen findet sich das Protein in der gesamten die Papillen überkleidenden Schicht, deren luminale Oberfläche

von einem Netzwerk überzogen wird (Abb. 3.16, Bild B, Pfeile). Da ZO-1 auch in TJ des Gefäßendothels lokalisiert, sind deutliche Reaktionen im Papillenstroma zu sehen. Diese können je nach Breite der Papille bei flüchtiger Betrachtung mit dem interzellulären Netzwerk der eigentlichen Karzinomzellen verwechselt werden (siehe Pfeilspitzen).

3.3.3 Claudin 1

Mit dem spezifischen Antikörper A gegen **Claudin 1** ist im papillären Karzinom keine spezifische Reaktion zu finden (Abb. 3.16, Bild C). Allerdings kommt es bei vier der betrachteten Fälle zu einer als unspezifisch zu bewertenden Farbreaktion. Eine Expression von Claudin 1 in diesem Karzinomtyp kann somit nicht belegt werden.

3.3.4 Claudin 2

Die papillären Nierenzellkarzinome zeigen hingegen eine Expression von Claudin 2, die allerdings ein inhomogenes Expressionsmuster ausweist. Hier reagieren vier von zehn untersuchten Fällen teils mäßig, teils stark positiv. Die Reaktionen sind eindeutig dem klassischen Bild eines TJ-Netzwerkes und dem zugehörigen Verteilungsmuster an den Interzellulargrenzen zuzuordnen (Abb. 3.16, Bild D, Pfeile).

3.3.5 Claudin 3

Sowohl mit dem Antikörper gegen **Claudin 3** von Zymed wie auch mit dem von Prof. Dr. Tsukita hergestellten ist in den papillären Nierenzellkarzinomen ein Nachweis dieses Proteins möglich. Mit dem Antikörper von Zymed reagieren alle untersuchten Karzinome stark positiv. Das feine Netzwerk ist in fast allen Papillenanschnitten zu sehen und entspricht der erwarteten Verteilung (Abb. 3.16, Bild E, Pfeile und Insert). Mit dem Antikörper von Prof. Dr. Tsukita reagieren vier der zehn untersuchten Fälle mäßig positiv. Daher bestätigt sich die Beobachtung, dass sich der kommerzielle Antikörper aufgrund seiner hohen Sensitivität besser zur Analyse der Expression von Claudin 3 eignet. Einer der Fälle zeigt mit beiden Antikörpern ein sehr eindeutiges Färbeverhalten und Reaktionen, die

sich besonders gut dem typischen Reaktionsmuster zuordnen lassen. Dieser Fall wird in der Abbildung 3.16 (Bild F, Pfeile) vorgestellt.

3.3.6 Claudin 4

Die Lokalisation von **Claudin 4** ähnelt sehr derjenigen von Claudin 3. Der monoklonale Antikörper gegen Claudin 4 zeigt ein konsistentes, überwiegend stark positives Reaktionsverhalten. Die klassischen feinen, interzellulären Netzwerke sind deutlich zu sehen (Abb 3.17, Bild A, Pfeile). Mit dem polyklonalen Antikörper von Prof. Dr.Tsukita ergibt sich hingegen keine spezifische Reaktion (Abb. 3.17, Bild B); eine mäßige, diffuse Farbreaktion in zwei der zehn untersuchten Fälle wird nicht als signifikant angesehen. Somit ist nur der monoklonale Antikörper zur Analyse der Expression von Claudin 4 geeignet (Abb. 3.17, Bilder A und B).

3.3.7 Claudin 8

Wie in den anderen Typen von Nierenzellkarzinomen ist auch im papillären Karzinom keine Reaktion mit dem Antikörper gegen **Claudin 8** nachweisbar (Abb. 3.17, Bild C). Daher wird davon ausgegangen, dass dieses Claudin in den Zellen des papillären Nierenzellkarzinoms nicht exprimiert wird und folglich nicht in den TJ lokalisiert ist.

3.3.8 Claudin 11

Im chromophoben Nierenzellkarzinom ist ebenso wie in den anderen Nierenzellkarzinomen kein Nachweis von **Claudin 11** möglich (Abb. 3.17, Bild D). Daher liegt nahe, dass auch dieses Protein in den TJ der Karzinome nicht angereichert wird.

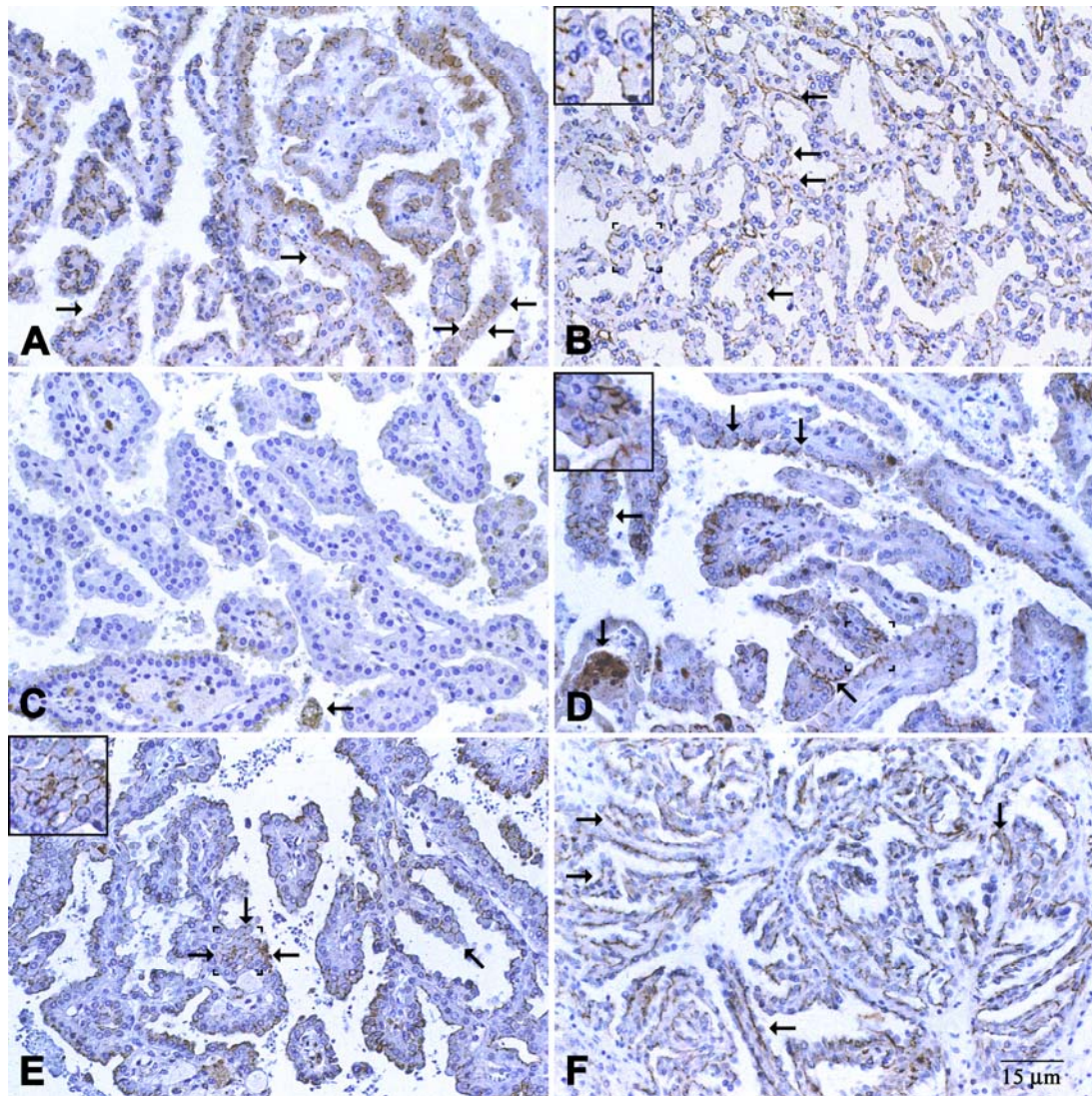


Abbildung 3.16: Immunhistochemische Analysen von Occludin (A), ZO-1 (B), Claudin 1 (C), Claudin 2 (D) und Claudin 3 (E, F) am **papillären Nierenzellkarzinom**.

Anhand von immunhistochemischen Untersuchungen an Paraffinschnitten von Gewebeproben aus papillären Nierenzellkarzinomen wird die Expression verschiedener TJ-Proteine in diesem Karzinom analysiert und miteinander verglichen. Occludin (A) wird exprimiert. Es zeigt sich ein feines interzelluläres Netzwerk, das die luminalen Zellgrenzen der Papillen umgibt (\rightarrow). ZO-1 (B) ist ebenfalls nachzuweisen. Hierbei wird die gesamte Papille von einem feinen Netzwerk (\rightarrow) durchzogen. Allerdings reagieren auch die Gefäße im Zottenstroma mit diesem Antikörper positiv. Daher ist es etwas schwierig, diese Reaktionen voneinander zu unterscheiden. Claudin 1 (C) wird in diesem Karzinom nicht exprimiert. Daher kommt es mit dem Antikörper (Lot-Nr. 11167698) nicht zu einer Reaktion. Der Antikörper gegen Claudin 2 (D; Zymed) bringt das klassische TJ-Netzwerk in den Papillen zur Darstellung. An den apikalen Zellpolen sind feine Linien, die Punkte miteinander verbinden, zu sehen (\rightarrow). Claudin 3 (E, F) wird konstant in diesem Karzinom exprimiert. Mit dem kommerziellen Antikörper gegen Claudin 3 (E) wird ein feines, wabenartiges Netz (\rightarrow), welches die gesamte Papille durchzieht, angefärbt. Mit dem Antikörper (Dr. Tsukita) gegen Claudin 3 (F) wird eine vergleichbare Färbung erzielt. Präparatbedingt ist

hier ein zartes Netzwerk zu erkennen, das eher in den basalen Abschnitten der Zellgrenzen (→) lokalisiert ist. Dennoch handelt es sich um ein klassisches TJ-Netzwerk.

Die Inserts oben links in den Bildern **B**, **D** und **E** zeigen typische Reaktionen in zweifacher Vergrößerung des Ausgangsbildes. Der vergrößerte Ausschnitt entstammt dem markierten Feld.

Strichmarke: 15 µm.

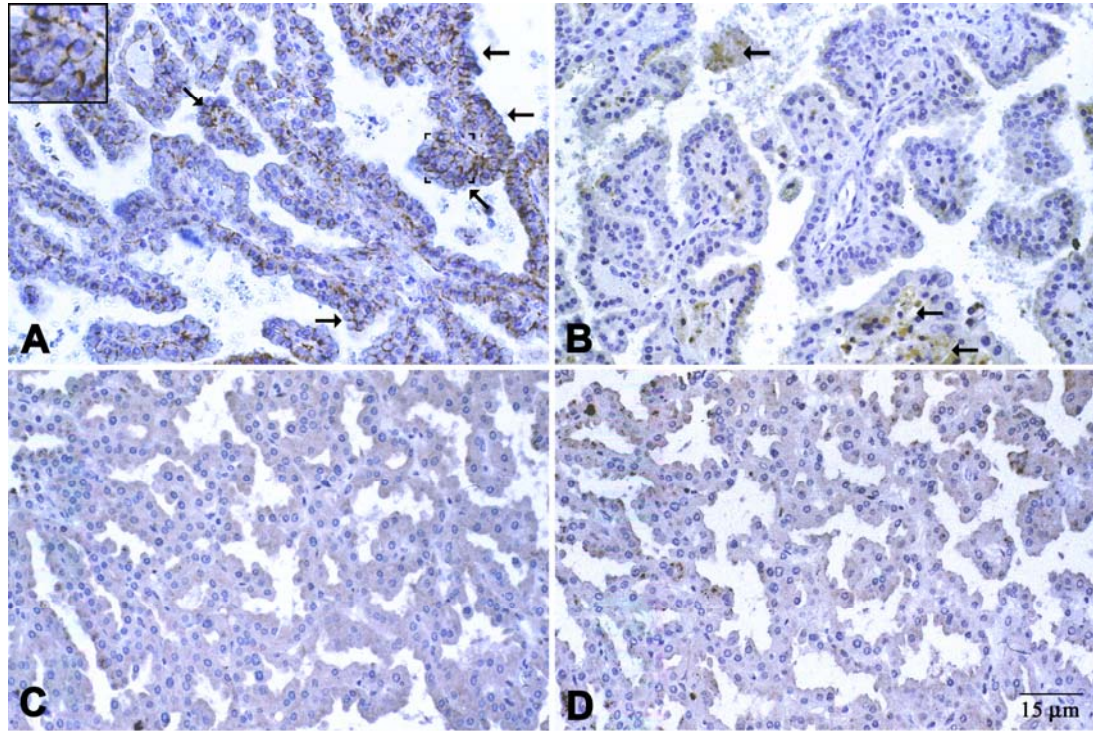


Abbildung 3.17: Immunhistochemische Analysen von Claudin 4 (**A** + **B**), Claudin 8 (**C**) und Claudin 11 (**D**) am **papillären Nierenzellkarzinom**.

An Paraffinschnitten von Gewebe aus papillären Nierenzellkarzinomen wird mittels Immunhistochemie die Expression von verschiedenen TJ-Proteinen analysiert und verglichen. Mit dem monoklonalen Antikörper gegen Claudin 4 (**A**) ist eine Expression von Claudin 4 nachzuweisen. Es kommt ein klassisches TJ-Netzwerk zur Darstellung, das zumeist die gesamte Papille durchzieht (→). Mit dem polyklonalen Antikörper (Dr. Tsukita) gegen Claudin 4 (**B**) ist keine Reaktion in den TJ zu erzielen. Es wird daher vermutet, dass dieser Antikörper weniger sensitiv ist und somit nicht zur Analyse der Expression von Claudin 4 im papillären Nierenzellkarzinom geeignet ist. Die Pfeile markieren Hämosiderinablagerungen. Claudin 8 (**C**) wird in diesem Karzinom nicht nachgewiesen. Auch Claudin 11 (**D**) kommt nicht zur Expression.

Das Insert oben links in Bild A zeigt eine typische Reaktion in zweifacher Vergrößerung des Ausgangsbildes. Der vergrößerte Ausschnitt entstammt dem gekennzeichneten Feld.

Strichmarke: 15 µm.

3.3.9 Vergleich zum normalen Nephron

Im papillären Nierenzellkarzinom kommt es zu einer konstanten Expression von Claudin 3 und Claudin 4, während die von Claudin 2 etwas heterogen ist. Im normalen Nephron verhält sich Claudin 3 nicht-selektiv und wird in allen Tubulusabschnitten beobachtet. Dagegen ist das Vorkommen von Claudin 4 auf die Zellen der Sammelrohre beschränkt. Claudin 2 wird selektiv in den proximalen Tubuli exprimiert, so dass es als Marker-Protein für diesen Abschnitt angesehen werden kann. Die Claudin 2-Befunde passen zu Beschreibungen in der Literatur. Hier wird das gleichzeitige Vorkommen von Villin, einem büstensaum-spezifischen Antigen, in den proximalen Tubuli sowie im papillären Nierenzellkarzinom festgestellt (Störkel, 1993). Aufgrund der hier gefundenen Koexpression von Claudin 2 und Claudin 4 lässt sich jedoch das papilläre Nierenzellkarzinom keinem normalen Tubulusabschnitt direkt zuordnen.

3.4 Immunhistochemische Befunde im chromophoben Nierenzellkarzinom

3.4.1 Occludin

Wie auch die papillären Nierenzellkarzinome reagieren alle sieben untersuchten chromophoben Nierenzellkarzinome mit den Antikörpern gegen Occludin und ZO-1. Mit dem Antikörper gegen **Occludin** färben sich Strukturen, die als feines Netzwerk um die Zellen verlaufen (Abb. 3.18, Bild A, Pfeile). Dabei sind meist Zellen angefärbt, die kleine irreguläre, zum Teil nur rudimentäre Lumina begrenzen.

3.4.2 ZO-1

Der Nachweis des Proteins **ZO-1** zeigt ein ähnliches Verteilungsmuster. Hier sind seltener die klassischen Wabenmuster zu sehen und es findet sich eine recht fokale Reaktion, die besonders deutlich um luminale Strukturen lokalisiert ist (Abb. 3.18, Bild B, Pfeile). Zwar sind die Färbungen

stellenweise etwas vereinzelt, doch sind die Reaktionen immer deutlich ausgeprägt.

3.4.3 Claudin 1

Da sich in der Immunhistochemie im chromophoben Karzinom mit dem Antikörper A gegen **Claudin 1** (Abb. 3.18, Bild C) dieses Protein nicht nachweisen läßt, wird es dementsprechend im hier untersuchten Tumortyp nicht exprimiert.

3.4.4 Claudin 2

Ebenso zeigt keines der chromophoben Karzinomgewebe eine Reaktion mit dem Antikörper gegen **Claudin 2** (Abb. 3.18, Bild D), so dass auch hier zu schlussfolgern ist, dass keine Expression erfolgt.

3.4.5 Claudin 3

In allen sieben untersuchten Fällen lokalisiert **Claudin 3** in den TJ des chromophoben Nierenzellkarzinoms. Die Färbung ist in allen Gewebeproben mit mäßig positiv zu bewerten. Das Verteilungsmuster dieses Proteins ähnelt sehr dem von Occludin. Die Reaktionen finden sich im Bereich der – teilweise nur rudimentären – Lumina und umgeben die Zellen meist als feines wabenartiges Netzwerk (Abb. 3.18, Bild E, Pfeile). Wie in den vorangehenden Betrachtungen lässt sich diese Expression mit dem von Prof. Dr.Tsukita bereitgestellten Antikörper nicht belegen. Daher bleibt abschließend die Feststellung zu treffen, dass für eine hochsensitive Analyse der Expression von Claudin 3 der Antikörper von Zymed besonders gut geeignet ist.

3.4.6 Claudin 4

Die kräftigste Farbreaktion zeigen die chromophoben Nierenzellkarzinome für **Claudin 4**. Mit dem monoklonalen Antikörper von Zymed reagieren alle sieben Fälle stark positiv. Das Verteilungsmuster zeigt das gewohnte Bild der TJ, die häufig um Lumina gruppiert sind (Abb. 3.18, Bild F, Pfeile). Dieser Nachweis lässt sich in abgeschwächter Weise auch

mit dem polyklonalen Antikörper gegen Claudin 4 von Prof. Dr. Tsukita zeigen (Abb. 3.19, Bild A, Pfeile). Hierbei reagieren alle sieben Fälle positiv, zwei davon stark positiv. In den Bildtafeln sind die zwei zu vergleichenden Antikörper gegen Claudin 4 mit der zugehörigen Reaktion an einer sich entsprechenden Stelle gezeigt (Abb. 3.18, Bild F und Abb. 3.19, Bild A).

3.4.7 Claudin 8

Claudin 8 kann im chromophoben Nierenzellkarzinom nahezu nicht nachgewiesen werden. Von den untersuchten Geweben reagieren sechs nicht mit diesem Antikörper. Dieses Ergebnis kommt in Abbildung 3.19 (Bild B) zur Darstellung. Lediglich in einem Fall kann sehr vereinzelt und schwach Claudin 8 gefunden werden.

3.4.8 Claudin 11

Auch mit dem Antikörper gegen **Claudin 11** wird bei keinem der sieben chromophoben Nierenzellkarzinome eine Reaktion gefunden (Abb. 3.19, Bild C), so dass vermutet werden kann, dass auch Claudin 11 von diesem Typ des Nierenzellkarzinoms nicht gebildet wird.

3.4.9 Vergleich zum normalen Nephron

Das chromophobe Nierenzellkarzinom weist in seinen TJ neben Occludin und ZO-1 aus der Claudinfamilie eine charakteristische Kombination aus Claudin 3 und Claudin 4 auf. Claudin 4 ist im Nephron als spezifischer Marker für die Zellen des Sammelrohres anzusehen. Für Claudin 3 kann keine segmentspezifische Verteilung benannt werden. Es kommt allerdings auch in den distalen Abschnitten des Tubulussystems vor. Somit entspricht das Claudin-Muster des chromophoben Nierenzellkarzinoms dem des Sammelrohres.

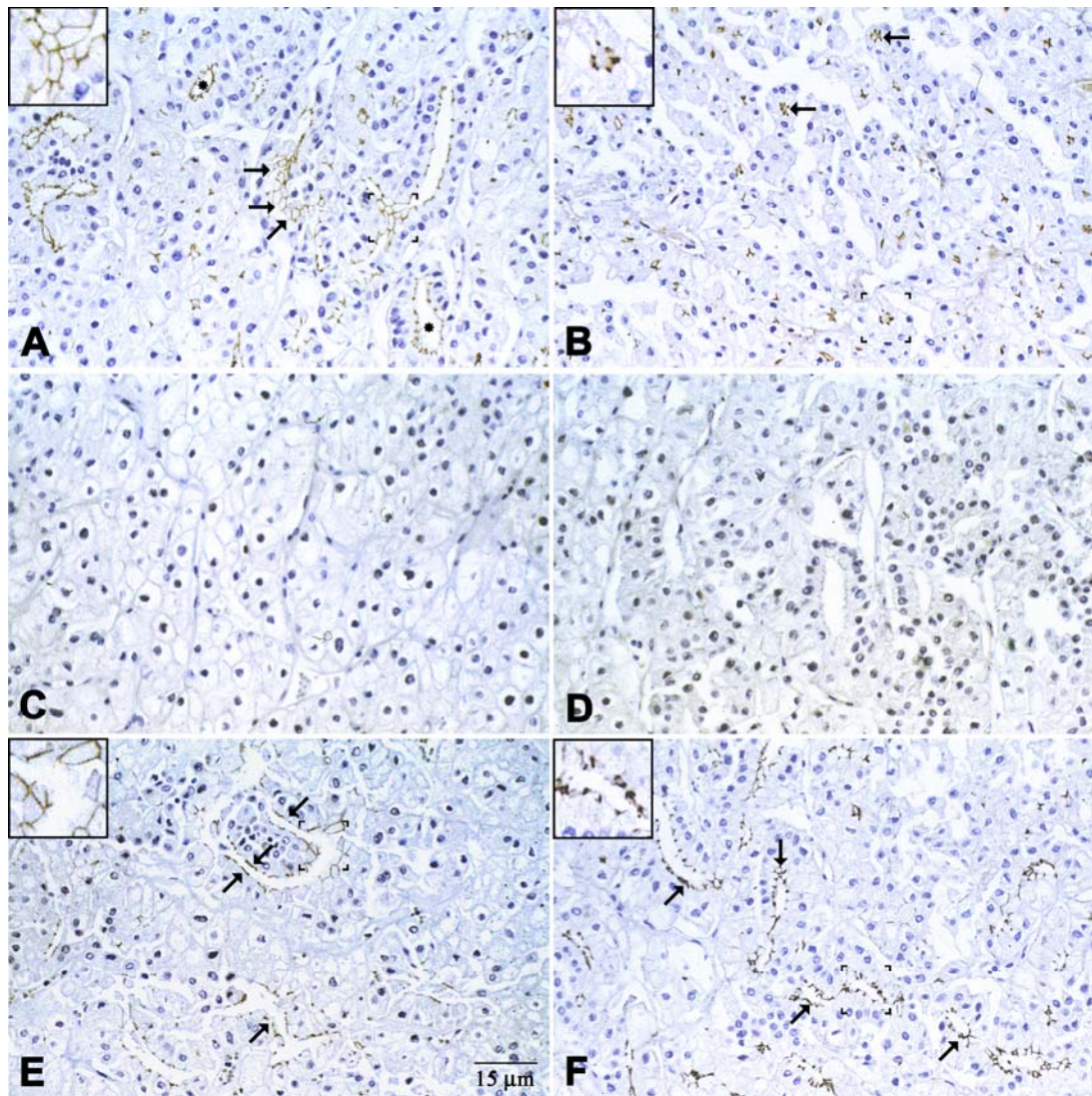


Abbildung 3.18: Immunhistochemische Analysen von Occludin (A), ZO-1 (B), Claudin 1 (C), Claudin 2 (D), Claudin 3 (E) und Claudin 4 (F) am **chromophoben Nierenzellkarzinom**.

An Paraffinschnitten von Gewebe aus chromophoben Nierenzellkarzinomen wird mit Hilfe der Immunhistochemie die Expression von einzelnen TJ-Markern analysiert und miteinander verglichen. Occludin (A) wird im chromophoben Karzinom exprimiert. Es zeigt sich ein honigwabenartiges, feines Netzwerk, das die Zellen in charakteristischer Weise umgibt (→). Die Reaktionen liegen häufig im Bereich rudimentärer Tubuluslumina (*). Ein Vorkommen von ZO-1 (B) in den TJ ist ebenfalls nachzuweisen. Die Färbung ist streng um rudimentäre, tubulär aufgebaute Lumina (→) gruppiert. Es erfolgt keine Expression von Claudin 1 (C; Lot-Nr. 11167698) in diesem Karzinom-Typ. Ebenso ist Claudin 2 (D; Zymed) nicht nachzuweisen. Claudin 3 (E; Zymed) wiederum wird im chromophoben Karzinom exprimiert. Dabei sind sowohl ein wabenartiges Netzwerk als auch luminal betonte Reaktionen zu erkennen (→). Der monoklonale Antikörper gegen Claudin 4 (F) belegt eine Expression dieses Proteins in den TJ. Hier ist ein TJ-Muster zu sehen, das mit dem der Sammelrohre im normalen Nierengewebe zu vergleichen ist. Die Färbung liegt an den Zellgrenzen der

apikalen Zellpole. Die Reaktionen sind streng um luminale Strukturen (→) lokalisiert.

Die Inserts oben links in den Bildern **A**, **B**, **E** und **F** zeigen typische Reaktionen in zweifacher Vergrößerung des Ausgangsbildes. Der vergrößerte Ausschnitt entstammt dem gekennzeichneten Feld.

Strichmarke: 15 µm.

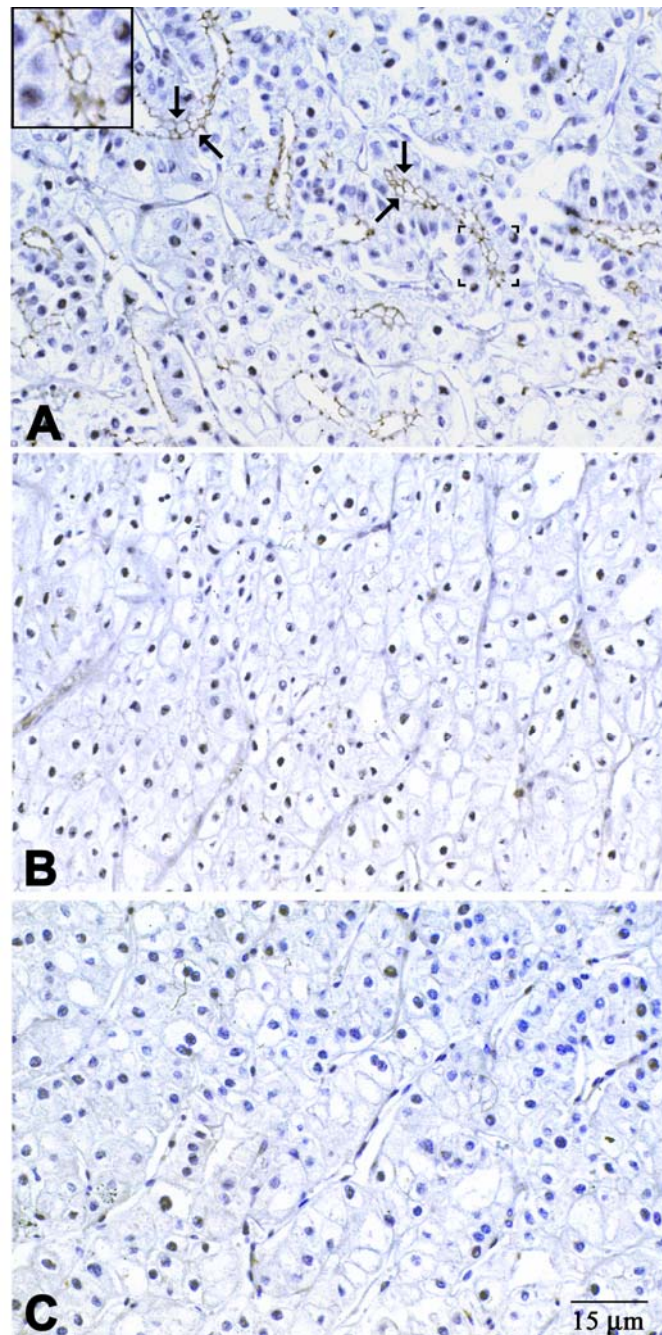


Abbildung 3.19: Immunhistochemischen Analysen von Claudin 4 (**A**), Claudin 8 (**B**) und Claudin 11 (**C**) am **chromophoben Nierenzellkarzinom**. Paraffinschnitte von Gewebeproben aus chromophoben Nierenzellkarzinomen wurden immunhistochemisch mit Antikörpern gegen einige TJ-Marker gefärbt. So kann deren spezifische Expression ermittelt und verglichen werden. Mit dem polyklonalen Antikörper (Dr. Tsukita) gegen Claudin 4 (**A**) kann eine Expression nachgewiesen werden. Das TJ-

Netzwerk kommt in gleicher Weise wie in Abbildung 3.17, Bild **F** zur Darstellung. Allerdings ist die Färbung nicht so kräftig ausgeprägt wie mit dem monoklonalen Antikörper. Claudin 8 (**B**) wird in diesem Karzinom nicht exprimiert. Ebenso ist kein Nachweis des Vorkommens von Claudin 11 (**C**) in den TJ dieses Karzinoms möglich.

Das Insert oben links in Bild **A** zeigt eine typische Reaktion in zweifacher Vergrößerung des Ausgangsbildes. Der vergrößerte Ausschnitt entstammt dem markierten Bereich.

Strichmarke: 15 µm.

3.5 Zusammenfassung

Die Expression der TJ-Proteine in den verschiedenen Nierenzellkarzinomen ist wie folgt verteilt: Occludin und ZO-1 werden im papillären und chromophoben Nierenzellkarzinom exprimiert. In keinem der Karzinome kommt es zu einer Expression von Claudin 1. Claudin 2 wird allein im klarzelligen und in einigen papillären Nierenzellkarzinomen gebildet. Claudin 3 wiederum lokalisiert in den TJ der papillären und chromophoben, jedoch nur sehr vereinzelt in denen der klarzelligen Nierenzellkarzinome. Das Vorkommen von Claudin 4 ist im papillären und chromophoben, nicht aber im klarzelligen Nierenzellkarzinom zu beobachten. Claudin 8 und Claudin 11 werden in keinem der untersuchten Karzinome exprimiert. Diese Beobachtungen sind in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Tabelle 3.10: Übersicht der Expression in Tumoren

	Klarzellig	Papillär	Chromophob
Occludin	-	+	+
ZO-1	-(+)	+	+
Claudin 1	-	-	-
Claudin 2	+	(+)	-
Claudin 3	(+)	+	+
Claudin 4	-	+	+
Claudin 8	-	-	-
Claudin 11	-	-	-

3.6 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen sollen nun die Ergebnisse aus den immunhistochemischen Betrachtungen erhärten. Es soll also gezeigt werden, dass die einzelnen Claudine in den drei verschiedenen Tumorentitäten unterschiedlich exprimiert werden. Dazu werden mit dem exakten Test nach Fisher-Yates die Expressionsmuster (siehe Kontingenztafeln) in den Tumorguppen nach Claudinen getrennt betrachtet und die zugehörigen p-Werte errechnet, die anschließend noch mit Hilfe der Holm-Prozedur adjustiert werden.

Liegen die p-Werte unterhalb des hierfür angenommenen p-Wertes, kann die Nullhypothese verworfen werden und somit ist eine statistisch signifikante Differenz der Claudin-Expression zwischen den verschiedenen Tumoren bewiesen.

Die statistischen Tests werden nur mit den Claudinen durchgeführt, die in den Tumoren überhaupt exprimiert werden. Es erfolgen also keine Analysen von Claudin 1, Claudin 8 und Claudin 11. Diese Claudine konnten in keinem der Tumoren nachgewiesen werden und tragen folglich nicht zur Unterscheidung bei.

3.6.1 p-Werte der Tumorentitäten

Tabelle 3.11: Kontingenztafel Claudin 2 Klarzellig versus Papillär

	Positiv	Negativ	Summe
Klarzellig	11	0	11
Papillär	4	6	10
Summe	15	6	21

In diesem Fall errechnet sich mit dem Test nach Fisher-Yates ein einseitiger p-Wert von $p_1=0,00387$.

Tabelle 3.12: Kontingenztafel Claudin 2 Klarzellig versus Chromophob

	Positiv	Negativ	Summe
Klarzellig	11	0	11
Chromophob	0	7	7
Summe	11	7	18

Aus dieser Claudin-Expression ergibt sich $p_2 = 0,000031$.

Tabelle 3.13: Kontingenztafel Claudin 2 Papillär versus Chromophob

	Positiv	Negativ	Summe
Papillär	4	6	10
Chromophob	0	7	7
Summe	4	13	17

Bei diesem Claudin-Besatz lässt sich mit dem Test nach Fisher-Yates $p_3 = 0,88235$ errechnen.

Tabelle 3.14: Kontingenztafel Claudin 3 Klarzellig versus Papillär

	Positiv	Negativ	Summe
Klarzellig	3	8	11
Papillär	10	0	10
Summe	13	8	21

Aus dieser Kontingenztafel ergibt sich $p_4 = 0,0008$.

Tabelle 3.15: Kontingenztafel Claudin 3 Klarzellig versus Chromophob

	Positiv	Negativ	Summe
Klarzellig	3	8	11
Chromophob	7	0	7
Summe	10	8	18

In dieser Betrachtung ergibt sich ein $p_5 = 0,0038$.

Tabelle 3.16: Kontingenztafel Claudin 3 Papillär versus Chromophob

	Positiv	Negativ	Summe
Papillär	10	0	10
Chromophob	7	0	7
Summe	17	0	17

In dieser Tabelle zeigt sich, dass bei beiden Tumoren keine negativen Reaktionen zu verzeichnen sind. Daher ist der Fisher-Test nicht durchführbar. Es lässt sich in diesem Falle also kein p-Wert angeben. Es bleibt also zu sagen, dass hier keine Signifikanz vorliegt und folglich kein Unterschied in der Expression von Claudin 3 zwischen diesen Tumorentitäten besteht.

Tabelle 3.17: Kontingenztafel Claudin 4 Klarzellig versus Papillär

	Positiv	Negativ	Summe
Klarzellig	1	10	11
Papillär	10	0	10
Summe	11	10	21

Bei diesem Muster der Claudin-Expression lässt sich $p_6=0,0000312$ berechnen.

Tabelle 3.18: Kontingenztafel Claudin 4 Klarzellig versus Chromophob

	Positiv	Negativ	Summe
Klarzellig	1	10	11
Chromophob	7	0	7
Summe	8	10	18

Aus dieser Kontingenztafel errechnet sich mit dem Fisher-Test ein p_7 von 0,0003.

Tabelle 3.19: Kontingenztafel Claudin 4 Papillär versus Chromophob

	Positiv	Negativ	Summe
Papillär	10	0	10
Chromophob	7	0	7
Summe	17	0	17

Auch in dieser Tafel ist zu ersehen, dass sich bei der Expression von Claudin 4 bei den zwei betrachteten Tumoren keinerlei Unterschied ergibt. Da in keinem Fall eine negative Reaktion auftritt, ist der Fisher-Test auch hier nicht durchführbar. Folglich lässt sich in diesem Fall kein p-Wert angeben. Auch hier liegt somit keine Signifikanz vor und die beiden Tumoren können anhand ihrer Expression von Claudin 4 nicht sicher voneinander unterschieden werden.

3.6.2 Adjustierung der p-Werte mit der Holm-Prozedur

Es ergibt sich folgende Reihenfolge, wenn die p-Werte nach der Größe beginnend mit dem kleinsten angeordnet werden. Diese werden gleich mit den adjustierten p-Werten verglichen.

$p_2=0,000031$	<	$p=0,05/18=0,0028$
$p_6=0,0000312$	<	$p=0,05/17=0,0029$
$p_7=0,0003$	<	$p=0,05/16=0,0031$
$p_4=0,0008$	<	$p=0,05/15=0,0033$
$p_5=0,0038$	<	$p=0,05/14=0,0036$
$p_1=0,00378$	<	$p=0,05/13=0,0038$
$p_3=0,88235$	>	$p=0,05/12=0,0042$

Hieraus lässt sich folgern, dass für alle Testungen außer Claudin 2 papillär versus chromophob die ermittelten p-Werte kleiner sind als die adjustierten p-Werte. Daher kann in diesen Fällen die Nullhypothese verworfen und die Gegenhypothese angenommen werden. Es ist also nur für Claudin 2 zwischen papillären und chromophoben Nierenzellkarzinomen ein negatives Testergebnis ermittelt worden. Dies bedeutet aber nicht den Nachweis eines fehlenden Unterschiedes, bestätigt also nicht die Null-Hypothese. Es könnte dennoch ein Unterschied in der Expression von Claudin 2 bestehen, der sich aber mit diesem Test statistisch nicht absichern lässt. Dies könnte auf die geringe Fallzahl zurückzuführen sein.

Ein signifikanter Unterschied in der Expression besteht also sowohl für Claudin 2 bei allen Vergleichen der Tumoren untereinander, als auch für Claudin 3 und Claudin 4 bei den Vergleichen von klarzelligen mit den papillären und chromophoben Nierenzellkarzinomen.

4 Diskussion

TJ sind ein Teil des Zelladhäsionskomplexes in der apikalen Zellmembran. Sie sind eine entscheidende Komponente der Zell-Zell-Verbindungen im Epithel und Endothel von vielzelligen Organismen (FARQUHAR & PALADE, 1963). Einerseits dichten sie den Zellzwischenraum – und damit das gesamte Epithel- oder Endothelhäutchen – gegen die Diffusion von gelösten Stoffen ab (SCHNEEBERGER ET AL. 1992, GUMBINER 1993). Dadurch schaffen sie eine Permeabilitätsbarriere für den parazellulären Stofftransport, der aber in zelltypspezifischer Weise selektiv ist. Andererseits erhalten sie die Polarität der Zellmembran aufrecht, in dem sie wie durch eine Grenze die Diffusion von Bestandteilen der Membran zwischen apikaler und basolateraler Oberfläche verhindern (SCHNEEBERGER ET AL. 1992, GUMBINER 1993). Nur so ist es möglich, innerhalb eines Organismus verschiedene Kompartimente aufrechtzuerhalten. Außerdem stehen sie mit verschiedenen Elementen des Zytoskeletts sowie mit Signaltransduktionsmolekülen in Verbindung (TSUKITA ET AL. 1999).

TJ bestehen aus einer Vielzahl von transmembranären (FURUSE ET AL. 1993, FURUSE ET AL. 1998, MORITA ET AL. 1999) und zytoplasmatischen Proteinen (BALDA ET AL. 1993, CITI ET AL. 1988). So sind neben Occludin (ANDO-AKATSUKA ET AL. 1996), den ZO-Proteinen (STEVENSON ET AL. 1986, JESAITIS ET AL. 1994, HASKINS ET AL. 1998) und den Claudinen (FURUSE ET AL. 1998) noch eine Reihe weiterer Proteine an Aufbau und Funktion der TJ beteiligt. Von den genannten Proteinen sind die Claudine eine völlig neu entdeckte Familie mit bislang mehr als 25 Mitgliedern, die eine zelltypspezifische Expression aufweisen. Das Interesse an diesen transmembranären Proteinen ist groß. Allerdings sind die Erkenntnisse über den exakten Aufbau der TJ noch immer nicht vollständig. Mit zunehmenden Erkenntnissen bezüglich der am Aufbau beteiligten Proteine und im Hinblick auf die zahlreichen physiologischen Ansprüche an die Eigenschaften der TJ

werden mehr und mehr Fragen aufgeworfen, in welchem Zusammenhang Aufbau und Funktion der TJ stehen.

Nicht zuletzt wegen der zelltyp-spezifischen Expressionsmuster der Claudine (MORITA ET AL. 1999) sind diese Proteine überaus interessant bei Analysen der Nierenzellkarzinome. Durch Erkenntnisse bezüglich eines tumor-spezifischen Verteilungsmusters lassen sich eventuell Vorteile bei der immunhistochemischen Diagnostik erzielen, und es können neue Aspekte in die Diskussion über die Histogenese der Tumoren eingebracht werden. Außerdem könnte es unter Umständen möglich werden, auf Basis der Claudine neue Schritte bei der Therapie der Nierenzellkarzinome zu gehen.

Unter diesen Gesichtspunkten sind die Ergebnisse dieser Arbeit nicht nur morphologisch, sondern auch physiologisch und pathophysiologisch zu betrachten.

4.1 Normales Nierengewebe

Besonders an der Niere, die ein funktionell wie morphologisch hochkomplexes Organ ist, sind die Untersuchungen sehr reizvoll. Das Epithel der Niere ist reich an TJ, die in den einzelnen Segmenten des Tubulussystems verschiedene Funktionen gewährleisten müssen. Die zum Teil sehr verschiedenen Anforderungen an die Dichtigkeit der TJ lassen an die Koexpression verschiedener Claudine zu unterschiedlichen Mustern denken. Denn FURUSE ET AL. (1999) können zeigen, dass Dichtigkeit der TJ und deren Aufbau aus einer Kombination verschiedener Claudine korrelieren. Außerdem stellt sich die Frage, inwiefern eine segmentspezifische Verteilung der Claudine Einfluss auf die Verschiedenartigkeit des parazellulären Transportes in den einzelnen Tubulusabschnitten nimmt.

Kürzlich haben KIUCHI-SAISHIN ET AL. (2002) ihre Aufmerksamkeit der Verteilung der einzelnen Claudine entlang des Tubulussystems gewidmet. Ihre Untersuchungen erfolgten an Nierengewebe der Maus. Diese Ergebnisse von KIUCHI-SAISHIN an der Mäuseniere werden in dieser Arbeit

erstmalig durch entsprechende Analysen an menschlichem Gewebe erweitert und mit dem Tiermodell verglichen.

Die Expression der einzelnen Claudine zeigt in den verschiedenen Zelltypen der Nieren beider Spezies viele Gemeinsamkeiten. Als gemeinsamer und charakteristischer Befund findet sich im proximalen Tubulus sowohl beim Menschen als auch bei der Maus Claudin 2. Dies wurde für die Maus auch bereits von ENCK ET AL. (2001) beschrieben. Doch während KIUCHI-SAISHIN darüber hinaus im proximalen Tubulus der Maus die Expression von Claudin 10 und Claudin 11 feststellt, kommt es im proximalen Tubulus des menschlichen Nierengewebes zum Auftreten von Claudin 3, nicht aber von Claudin 11. Gegen Claudin 10 liegt kein Antikörper vor, der für die Immunhistochemie an Paraffingewebe gängig ist. Auch das Bowmansche Kapselepithel zeigt im Wesentlichen gemeinsame Befunde (Claudin 1 und Claudin 2), aber auch hier ist nur beim Menschen zusätzlich Claudin 3 nachweisbar. Im distalen Tubulus stimmen unsere Untersuchungen hinsichtlich der Lokalisation von Claudin 3 überein. Beim Menschen kommt überdies Claudin 11 ausschließlich in diesem Nephronsegment vor, während KIUCHI-SAISHIN ET AL. (2002) bei der Maus eine Expression von Claudin 8 feststellen. Hinsichtlich des Sammelrohres entsprechen sich die Ergebnisse bei Mensch und Maus vollständig. So werden in diesem Nephronabschnitt in beiden Systemen sowohl Claudin 3 und Claudin 4, als auch Claudin 8 gefunden.

Bei der Analyse des Auftretens der Claudine in Maus und Mensch in der Henle-Schleife wird bei KIUCHI-SAISHIN ET AL. der dicke aufsteigende Ast der Schleife zugerechnet. In dieser Arbeit werden die dicken Anteile als partes rectae den angrenzenden distalen Tubulusabschnitten zugerechnet und die dünnen Anteile zusammen als Henle-Schleife selbständig betrachtet (JUNQUEIRA ET AL. 2002). So finden KIUCHI-SAISHIN ET AL. im dünnen absteigenden Ast der Henle-Schleife ausschließlich die Expression von Claudin 2, während sich im dünnen aufsteigenden Ast sowohl Claudin 3 und Claudin 4, als auch Claudin 8 nachweisen lassen. In der hier vorliegenden Arbeit kann im dünnen Anteil der Schleife beim Menschen nur die

Expression von Claudin 3 verzeichnet werden, während kein Vorkommen von Claudin 4 und Claudin 8 nachzuweisen ist. Im dicken aufsteigenden Ast der Henle-Schleife (bzw. pars recta des distalen Tubulus) finden KIUCHI-SAISHIN ET AL. die Expression von Claudin 3, Claudin 10, Claudin 11 und Claudin 16. Für Claudin 3 und Claudin 11 können diese Ergebnisse direkt auch für das menschliche Nierengewebe bestätigt werden. Gegen die Claudine 10 und 16 sind in dieser Arbeit keine Antikörper verfügbar. Vollständige Analysen sämtlicher Claudine auf Zelltypebene – somit mit immunhistochemischem Ansatz – sind zum gegenwärtigen Zeitpunkt noch nicht möglich, da es für eine Reihe von Claudinen noch keine spezifischen Antikörper gibt: dies gilt sowohl für den Menschen als auch für die Maus. Kürzlich ist eine Claudin-Expressionsstudie an der Kaninchen-Niere erschienen, in der ebenfalls teils Gemeinsamkeiten, teils Unterschiede in den Mustern entlang des Tubulussystems gefunden werden können. Diese Unterschiede beziehen sich sowohl auf den Vergleich zur menschlichen Niere, als auch auf die Betrachtungen an der Mäuseniere (REYES ET AL. 2002).

Abschließend kann festgestellt werden, dass sich menschliches Nierengewebe bezüglich der Verteilung der einzelnen Claudine entlang des Tubulussystems nur in wenigen Ausnahmen vom Nierengewebe der Maus unterscheidet.

Diese prinzipielle Übereinstimmung des zelltypspezifischen Auftretens der einzelnen Claudine in den homologen Abschnitten des Nephrons bei Mensch und Maus ist mit den unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften der entsprechenden Abschnitte verbunden. Dies geht aus einer Reihe aktueller Untersuchungen über die Interaktionen von verschiedenen Claudinen hervor, die im folgenden kurz dargestellt werden. Bestimmte Claudine können sich, entsprechend des heute gängigen Modells, an der lateralen Seite einer Zellmembran zu Homo- und Heteropolymeren verbinden. Diese können nun mit entsprechenden Komplexen auf Membranen benachbarter Zellen zu TJ-Zügen in homo- und heterophiler Assoziation zusammentreten (FURUSE ET AL. 1999; TSUKITA & FURUSE 2002).

Hierdurch entsteht ein bisweilen hochkomplexer Aufbau der TJ, der die unterschiedlichen funktionellen und physiologischen Eigenschaften dieser Zell-Zellverbindungen in unterschiedlichen Geweben widerspiegelt. Diese Effekte auf die funktionellen Eigenschaften der TJ, die sich aus dem unterschiedlichen Besatz dieser Strukturen mit einzelnen Claudinen ergeben, haben FURUSE ET AL. (1999) in überzeugender Form experimentell darstellen können. Sie können zeigen, dass die Expression von Claudin 2 in MDCK-Zellen von entscheidender Bedeutung für den transepithelialen Widerstand (transepithelial resistance, TER) ist (FURUSE ET AL. 2001). Während MDCK-I-Zellen nur Claudin 1 und Claudin 4 exprimieren und einen hohen TER aufweisen, kommt in MDCK-II-Zellen zusätzlich Claudin 2 vor, und der TER ist weitaus niedriger. Dies legt nahe, dass Claudin 2 für den geringeren TER verantwortlich ist. Entsprechend führt die Transfektion von Claudin 2 in die MDCK-I-Zellen zu einem massiven Absinken des TER, ohne dabei Einfluss auf die Verteilung der anderen TJ-Proteine, wie Claudin 1 und 4 oder ZO-1, zu nehmen. Auch die Morphologie der TJ bleibt in diesem Experiment unverändert. So zeigen die Autoren, dass das Vorkommen von Claudin 2 in den Strängen der TJ zu einer verstärkten Durchlässigkeit führt, welche aber nicht in einem morphologischen Defizit oder gar einer Zerstörung der TJ begründet liegt.

Es stellt sich nun die Frage, wie das Vorkommen von Claudin 2 in den TJ zu einer solchen Abnahme des TER führen kann, wenn an der Morphologie der TJ selbst nichts verändert zu sein scheint. Hier sind die Untersuchungen von FURUSE ET AL. (2001) und AMASHEH ET AL. (2002) sehr aufschlussreich. In einem analogen in-vitro-System von MDCK-Sublinien bewirkt die Transfektion von Claudin 2 eine Abnahme des TER um den Faktor fünf bis sechs. Dies beruht darauf, dass insbesondere die Permeabilität für Kationen stark ansteigt, während der Flux von Mannitol oder Laktulose unverändert bleibt. Hieraus leiten die Autoren folgendes Modell ab. Claudin 2 führt zur Ausbildung von Kanälen, die selektiv für Kationen sind und damit die ehemals dichten TJ durchlässig („leaky“) machen. Diese Kanäle machen aus einer fest geschlossenen TJ eine lecke („leaky“). Allerdings wird die

Barrierefunktion für größere Moleküle aufrechterhalten (vergleiche auch FURUSE ET AL. 2001).

Diese Ergebnisse für die Funktion von Claudin 2 lassen direkte Rückschlüsse auf die Physiologie der Niere zu. Sowohl für menschliches Nierengewebe (diese Arbeit) als auch im Nierengewebe der Maus (ENCK ET AL. 2001; KIUCHI-SAISHIN ET AL. 2002) wird im proximalen Tubulus Claudin 2 gebildet. Bereits HEGEL ET AL. (1967) haben für diesen Nephronabschnitt einen mit etwa $5\text{-}6\ \Omega/\text{cm}^2$ sehr geringen TER gemessen und hier eine höhere Durchlässigkeit festgestellt. Dies entspricht auch den physiologischen Abläufen bei der Harnveränderung in den proximalen Tubuli. Nachdem im Glomerulum ein eiweißarmes Ultrafiltrat des Blutes gebildet wird, muss im Verlauf des Tubulussystems eine Konzentrierung von anfänglich 180 Liter am Tag auf etwa ein bis zwei Liter sowie eine Veränderung der stofflichen Zusammensetzung erfolgen. Ein Großteil der Rückresorption erfolgt im proximalen Tubulus. So sind am Ende dieses Abschnittes beim Gesunden bereits sämtliche Aminosäuren und Glukose, sowie 70% des enthaltenen Natriums und Wassers entfernt. Während die organischen Bestandteile zumeist aktiv über Transportproteine transzellulär durch das Nierenepithel aus dem Primärharn entfernt werden, kommt es zu einem passiven, parazellulären Ausstrom von zahlreichen Elektrolyten und von Wasser entlang des Diffusionsgradienten und entgegen des lumenpositiven Potentials im proximalen Tubulus. Diese Anforderungen für durchlässige TJ finden in der hier vorherrschenden Expression von Claudin 2 die molekulare Korrelation. Auch die Forderung eines kationen-selektiven Kanals, der durch Claudin 2 gebildet wird, erscheint an dieser Stelle sinnvoll. Aus dem Primärharn wird nur Natrium aktiv resorbiert. Alle weiteren Kationen wie Kalium, Magnesium und Calcium folgen auf parazellulärem Wege passiv nach. Es bleibt an dieser Stelle allerdings die Frage offen, wie und ob die Anionen, insbesondere Chlorid, den proximalen Tubulus parazellulär verlassen.

Ein interessanter Nebenfund ist die Verteilung von Claudin 3 im proximalen Tubulus, das spezifisch nur in den Plica-Zellen nachweisbar ist,

kleinen undifferenzierten Epithelzellen, die auf Basalmembranfaltens aufsitzen (MOLL ET AL. 1991). Obgleich die biologische Bedeutung dieser Zellen noch nicht geklärt ist, unterstreicht der vorliegende Befund die Eigenständigkeit der Plica-Zellen als besonderer Zelltyp des menschlichen proximalen Tubulus.

Dem im proximalen Tubulus dominierenden Claudin 2 steht das Claudin 4 gegenüber, das ausschließlich im Sammelrohr nachweisbar ist. VAN ITTALIE ET AL. (2001) untersuchen die Effekte der Claudin 4-Expression auf den TER, um Aufschlüsse über die Ursachen der Ionenselektivität des parazellulären Transportes und der Funktion der Claudine zu erhalten. Die Autoren können zeigen, dass die Überexpression von Claudin 4 in MDCK-Zellen zu einer massiven Abnahme der Natrium-Permeabilität um etwa 50% führt, während die Durchlässigkeit für Chlorid nahezu unverändert bleibt. Der TER nimmt um den Faktor drei bis vier zu. Claudin 4 macht es also möglich, dass die TJ zwischen Natrium und Chlorid unterscheiden kann. Es zeigt sich, wie schon bei den Analysen zu Claudin 2, dass alle anderen Proteine in den TJ in ihrer Verteilung unverändert bleiben. Die Autoren vermuten hierbei, dass das Auftreten bestimmter, besonders geladener Aminosäuren an spezifischen Positionen der Primärsequenz der Claudin-Polypeptide diese Ionenselektivität bedingt. Die übrigen Polypeptidbereiche, die innerhalb der Claudin-Familie relativ stark konserviert sind, bedingen dahingegen die enge Zelladhäsion in den TJ. VAN ITALLIE (2001) sieht hier auch einen engen Zusammenhang zu einer sehr eingeschränkten und gewebsspezifischen Verteilung einzelner Claudine, wie zum Beispiel die von Claudin 5 (MORITA ET AL. 1999A) und Claudin 11 (Morita et al. 1999b). Ebenfalls haben MCCARTHY ET AL. (2000) den Einfluss der exogenen Claudin 4-Expression auf die Dichtigkeit und Morphologie der TJ untersucht. Claudin 4 wird lediglich vermehrt in die Stränge bestehender TJ eingebaut. Zusätzlich werden neue TJ, auch unter Verwendung des überexprimierten Claudin 4, gebildet. Daher ist in elektronenmikroskopischen Analysen zu erkennen, dass es insgesamt zu einer Zunahme der TJ-Stränge kommt, und das Netzwerk mehr Verzweigungen mit komplexeren Strangmustern aufweist. Dass die verminderte Natrium-Permeabilität auf parazellulären

Transportmechanismen beruht, zeigt sich daran, dass auch die Blockade von Transportproteinen mit Amilorid und anderen Substanzen keinerlei Effekt auf die Natrium-Permeabilität hat. Hinzu kommen Änderungen der Diffusion von Kalium, Lithium und anderen Kationen. Zur Zeit wird deswegen ein Modell bevorzugt, welches Claudin 4 in Verbindung mit der Ausbildung ionenselektiver Kanäle bringt. Diese scheinen selektiv die Diffusion von Kationen zu verhindern, wohingegen keinerlei Effekte bei der Diffusion von Anionen zu Tage treten. Da der Mannitol-Flux ebenfalls unverändert bleibt, ist anzunehmen, dass die Größe der passierenden Moleküle keinen Einfluss hat.

Der Einfluss auf die Selektivität des parazellulären Transportes durch Claudin 4 hat für die Physiologie der Niere direkte Konsequenzen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Claudin 4 ausschließlich im Sammelrohr vorkommt (vergleiche auch KIUCHI-SAISHIN ET AL. 2002). Es scheint sinnvoll, dass in einem Abschnitt des Nierentubulussystems, in dem es zu einer Konzentrierung des anfangs isotonen zu einem hypertonen Harn kommt, sehr dichte TJ ausgebildet werden müssen. So herrscht im Sammelrohr ein TER von $860\text{--}2000\ \Omega/\text{cm}^2$ (HELMER ET AL 1974). Daher fordert REUSS (2001), dass ein hoher TER direkt auf der Dichtigkeit der TJ beruht. Diese Eigenschaft der TJ ist an eine hohe Anzahl von TJ-Strängen gekoppelt (CLAUDE ET AL. 1973). Im Sammelrohr stehen sämtliche Veränderungen von Ionenkonzentrationen und Wassergehalt unter der Kontrolle verschiedener Hormone. So regelt das Antidiuretische Hormon (ADH) je nach diuretischer Lage des Stoffwechsels eine fakultative Resorption von Wasser. Außerdem wird über Aldosteron und Atriopeptin Einfluss auf den Gehalt von Natrium im Urin genommen. Dieses kann bei Bedarf zum Teil gegen einen massiven Konzentrationsgradienten aktiv aus dem Harn resorbiert werden (HIERHOLZER & FROMM 2000). Hierzu ist es verständlicherweise erforderlich, dass die TJ das entsprechende Gewebe dicht verschließen, damit es nicht zu einem unkontrollierten Rückstrom von Elektrolyten in den Harn kommt. Außerdem sollten die TJ verhindern, dass Wasser passiv zum Konzentrationsausgleich in den Harn strömt, der in diesem Abschnitt der Niere nochmals eine starke Konzentrierung erfährt.

Von welcher Bedeutung Claudin 4 für die Dichtigkeit der TJ ist, zeigen auch Versuche mit dem Enterotoxin von *Clostridium perfringens* (CPE). Dieses bindet mit seinem COOH-Terminus selektiv an Claudin 4 in TJ des Darmes und entfernt es aus diesen. Dies führt zu einer massiven Abnahme des TER, der sich elektronenmikroskopisch in einer Verplumpung (kurze, wenig verzweigte Fibrillen von geringer Tiefe) des TJ-Netzwerkes widerspiegelt (SONODA ET AL. 1999; FUJITA ET AL. 2000). In der Folge kommt es zu einem massiven Wasser- und Elektrolytverlust in Form einer schweren Diarrhoe, die entscheidend für die Klinik der Cholera ist.

Es fallen also Claudin 2 und Claudin 4 durch ihre sehr restriktive Verteilung entlang des Tubulussystems auf. Dies scheint auf physiologischer Ebene von großer Bedeutung zu sein.

Allerdings scheint den Veränderungen in der Dichtigkeit der TJ noch mindestens ein weiterer Mechanismus zugrunde zu liegen. So zeigen GALLARDO ET AL. (2002), dass verschiedene Peptide, die aus Hunde-Urin isoliert werden können, eine reversible Erhöhung des TER bewirken. Dieser Effekt ist abhängig von der Konzentration der Peptide und unabhängig von der Temperatur. Es stellt sich weiter heraus, dass es weder zu einer Erhöhung der Fibrillenzahl noch zu einer Veränderung der TJ-Proteine kommt. GALLARDO ET AL. vermuten daher, dass die Peptide indirekt Einfluss auf die Regulierungsvorgänge an der TJ nehmen, möglicherweise über (De-) Phosphorylierung von assoziierten Proteinen.

Bei der Betrachtung der Expression von Claudinen im distalen Tubulus scheint eine Zuordnung zu spezifischen Funktionen nicht so eindeutig möglich zu sein wie in den übrigen Nephronsegmenten. In diesem Segment können Claudin 3 und Claudin 11 nachgewiesen werden. Von diesen TJ-Proteinen ist bislang kein spezifischer Effekt bezüglich der Dichtigkeit der TJ und der Ausbildung eines speziell geformten Netzwerkes bekannt. Eine hohe histochemische Aktivität der Natrium-Kalium-ATPase weist auf einen regen aktiven Transport von Soluten durch die Tubuluszellen hin. Der

parazelluläre Transport von Ionen scheint in diesem Abschnitt nur noch von untergeordneter Bedeutung zu sein. Allerdings ist die Pars convoluta der distalen Tubuli wieder durchlässig für Wasser. Der distale Tubulus ist zusammen mit dem Sammelrohr das Segment der hormonellen Regulationsprozesse. Hier wirken Aldosteron, Adiuretin, Kalzitonin und Parathyrin. Es wird also aktiv auf das Ausmaß der Resorption von Wasser und Ionen, insbesondere Calcium und Phosphat, Einfluss genommen. Daher ist zu vermuten, dass in diesem Tubulusabschnitt – nebst Dichtigkeit – keine speziellen Anforderungen an die Ionenselektivität der TJ gestellt werden. Dies findet sein Korrelat in der Expression von Claudin 3, das auch in allen anderen Nephronsegmenten gefunden werden kann. Es bleibt aber offen, ob Claudin 11, das in der Niere selektiv nur im distalen Tubulus gefunden werden kann, eine spezifische Bedeutung für die TJ dieses Segmentes hat. Claudin 11 ist bislang eher als spezifisch für die TJ in Myelin-Scheiden des Nervengewebes und in den Sertoli-Zellen des Hodengewebes angesehen worden (GOW ET AL. 1999).

Interessanterweise unterscheidet sich die Henle-Schleife (dünner Teil, Tubulus intermedius) in ihren TJ-Proteinen von allen anderen Tubulussegmenten, indem unter den untersuchten Claudinen ausschließlich Claudin 3 vorkommt. Dies weist auf eine spezialisierte Funktion der TJ in diesem Abschnitt hin.

Ein weiterer interessanter Befund stellt sich in der Bowman-Kapsel dar. Ausschließlich in diesem Abschnitt kommt Claudin 1 vor. Unter anderen Organen kann Claudin 1 bisher in Herz, Lunge, Leber und Hoden nachgewiesen werden (TSUKITA ET AL. 2001). Es ist also eher ein recht verbreitetes Claudin. Das Epithel der Bowman-Kapsel zeichnet sich durch ausschließlich abdichtende, nicht aber resorbierende Funktion aus (JUNQUEIRA ET AL. 2002), was möglicherweise mit der besonderen Claudinverteilung korreliert.

In der hier vorliegenden Arbeit ist auch erstmals in der menschlichen Niere das Expressionsmuster der TJ-Marker Occludin und ZO-1 betrachtet

worden. Hier liegen Ergebnisse von GONZALEZ-MARISCAL ET AL. (2000) am Kaninchen vor, die hier für den Menschen vollkommen bestätigt werden können. In der genannten Arbeit wird die Expression von Occludin, ZO-1 und ZO-2 entlang von isolierten Nierentubuli des Kaninchens untersucht. Wie beim Menschen finden sich Occludin und ZO-1 in den TJ entlang des gesamten Tubulussystems vom proximalen Tubulus bis in die Sammelrohre. ZO-1 zeigt in allen Segmenten das klassische, feine TJ-Netzwerk, das die Zellen wabenartig umgibt. Occludin ist in den proximalen Tubuli eher punktuell zu finden, während die dichten TJ-Muster erst im Verlauf der Henle-Schleife zunehmen (GONZALEZ-MARISCAL ET. AL 2000). Die Proteine scheinen sich also beim Menschen und beim Kaninchen sowohl im Bezug auf ihr Vorkommen als auch hinsichtlich der Intensität der Expression zu entsprechen.

4.2 Nierenzellkarzinome

Die Nierenzellkarzinome sind eine Gruppe von Tumoren, die sich durch eine große Heterogenität und zahlreiche morphologische Feinheiten sowie auch charakteristische zyto- und molekulargenetische Unterschiede auszeichnen. Seit der Beschreibung des ersten Nierentumors durch GIOVANNI BATISTA MORGAGNI (1682-1771) sind viele weitere Tumoren hinzugekommen. Aufgrund der Vielzahl der Tumorformen sind einige Versuche unternommen worden, die Tumoren in verschiedene Gruppen zu ordnen. Hierzu hat man sich den Tumoren auf sehr verschiedene Weise genähert. Zum einen hat GRAWITZ (1883) ein histogenetisches Prinzip zur Einteilung der Tumoren gefordert, wobei sich seine Hypothese einer Ableitung von Nebennierenrindengewebe allerdings nicht bestätigt hat. Zum anderen hat sich APITZ (1943) erstmals für ein Schema zur Einteilung nach zytomorphologischen Gesichtspunkten ausgesprochen (STÖRKEL 1999, 2002).

In der 80er Jahren haben THOENES ET AL. (1986) den Ausschlag für ein Klassifikationsschema der Tumoren anhand von zytologischen und histologischen Merkmalen gegeben. Das Schema sieht eine Unterteilung in

fünf Subtypen vor, namentlich: klarzellige, chromophile, chromophobe, onkozytäre Tumoren sowie Tumoren des Sammelganges. Dieses System wird im Verlauf der Zeit mit immunhistochemischen Analysen weiter gestärkt. Dabei werden auch histogenetische Aspekte nicht außer Acht gelassen. STÖRKELE beschreibt 1993 zahlreiche immunhistochemische Merkmale, die das bestehende System der Morphologie stützen und durch diesen Beitrag zur Histogenese weiter untermauern.

Ein neuer Aspekt kommt in die Klassifikation, als in den frühen 90er Jahren erste zytogenetische Untersuchungen der Tumoren erfolgen und sich abzeichnet, dass aufgrund verschiedener Genotypen ein weiteres Schema zur Einteilung geschaffen ist. Hierbei lassen sich der klarzellige, der papilläre und der chromophobe Typ eindeutig voneinander abgrenzen und charakteristischen chromosomalen Alterationen zuordnen. Inzwischen sind diese Befunde teilweise auf die molekulargenetische Ebene ausgeweitet worden, es können also einzelne betroffene Gene angesprochen werden.

Unter Beachtung all dieser Entwicklungen trifft sich 1997 in Heidelberg ein Gremium von WHO-Mitarbeitern mit der Union Internationale Contre le Cancer (UICC) und dem Joint Committee on Cancer, um die WHO-Klassifikation von 1981 ebenso wie deren Neuerung von 1998, die den Erwartungen nicht gerecht werden konnte, zu überarbeiten. Dieser Konferenz entstammt die sogenannte „Heidelberg-Klassifikation“. In dieser Einteilung werden alle bis dorthin erhobenen Untersuchungen zu den Nierenzelltumoren berücksichtigt und so vereinfachend zusammengefasst, dass man drei Gruppen von Adenomen und fünf von Karzinomen sowie eine von nichtklassifizierbaren Karzinomen unterscheidet. Dies sind bei den Adenomen der metanephrogene, der papilläre und der onkozytäre Typ, bei den Karzinomen der klarzellige, der papilläre, der chromophobe, der neuroendokrine Typ und Karzinome vom Sammelgang-Typus (KOVACS ET AL. 1997).

Da die Familie der Claudine eine bisweilen ausgeprägte Zelltypspezifität aufweist, liegt es nahe, das Expressionsmuster der verschiedenen Claudin-

Proteine mit der Einteilung der Nierenzellkarzinome und den zugrundeliegenden histogenetischen Annahmen zu korrelieren. In der vorliegenden Arbeit wird tumoröses Gewebe untersucht, das bereits anhand des oben genannten Schemas diagnostisch klassifiziert worden ist.

Es zeigt sich, dass sich drei Gruppen von Nierenzellkarzinomen mit einer jeweils ganz typenspezifischen Koexpression einzelner Claudine abgrenzen lassen und diese Gruppen dabei mit definierten pathologischen Entitäten gemäß des genannten Klassifikationsschemas übereinstimmen. So sind die klarzelligen Nierenzellkarzinome vorrangig durch das Vorkommen von Claudin 2 charakterisiert. Des weiteren lässt sich zu einem geringeren Anteil auch eine Expression von Claudin 3 nachweisen. Das papilläre Nierenzellkarzinom lässt sich durch das Vorkommen von Claudin 3 und Claudin 4 sowie durch die etwas inhomogene Expression von Claudin 2 beschreiben. Das chromophobe Karzinom hingegen ist insbesondere durch massives Auftreten von Claudin 4 sowie zusätzlich von Claudin 3 zu charakterisieren.

Diese Verteilung der tumorspezifischen Claudin-Expression soll nun auch im Hinblick auf die Histogenese der Tumoren interpretiert werden. So findet STÖRKEL (1993) in seinen Analysen des Immunphänotyps in den klarzelligen Nierenzellkarzinomen das überwiegende Vorkommen von bürstensaum-spezifischen Antigenen wie Villin, Gamma-Glutamyltransferase (GGT) und Cluster of Differentiation (CD) 10 und CD 13. Diese Antigene sind alle ebenfalls spezifisch im proximalen Tubulus zu finden. Antigene, die hingegen in den distalen Abschnitten vorkommen, sind nicht oder nur vereinzelt in den klarzelligen Nierenzellkarzinomen nachzuweisen (zum Beispiel das auch in dieser Arbeit verwendete Tamm Horsfall Protein (THP)). Aus dieser Antigenkonstellation, unter Berücksichtigung histomorphologischer Kriterien, kommt STÖRKEL zu dem Schluss, dass sich die klarzelligen Nierenzellkarzinome aus Zellen der proximalen Tubuli ableiten. Entsprechende Analysen führt STÖRKEL auch für das chromophobe Nierenzellkarzinom durch. Hier deuten der Nachweis von Antigenen wie Epitheliales Membran-Antigen (EMA) und MB2 (kommerzielle

Antikörper-Codebezeichnung), die spezifisch im Sammelrohr vorkommen, sowie die ausbleibende Reaktion für GGT, Villin, CD 10 und CD 13 auf eine histogenetische Abstammung dieses Karzinoms von Zellen der Sammelrohre hin. Die gleichzeitige Expression von Dolichus-biflorus-Antigen (DBA), Ulex-europaeus-Agglutinin (UEA 1), Carboanhydrase C (CAC) sowie Epitheliales Membran-Antigen (EMA) erlaubt dabei innerhalb des Sammelrohres eine Zuordnung zu den Schaltzellen (STÖRKE, 1993). Dies wird ebenfalls durch histomorphologische Merkmale der Zellen gestützt.

Etwas schwieriger stellt sich die Beurteilung der Histogenese der papillären Nierenzellkarzinome dar. Hier sind sämtliche Antigene, die spezifisch im proximalen Tubulus vorkommen (GGT, Villin, CD 10 und CD 13), auch im Tumor nachzuweisen. Zugleich kommt es aber auch zu einer Expression von EMA und MB2. Daher ist eine eindeutige Aussage nicht sicher möglich. Störkel spricht sich aber, nicht zuletzt aufgrund der Morphologie, für eine Abstammung dieses Tumors aus Zellen der proximalen Tubuli aus.

Diese von phänotypischen Assoziationen abgeleiteten histogenetischen Hypothesen sind bislang noch nicht experimentell bewiesen und teilweise sogar umstritten. So postuliert die Arbeitsgruppe von BANNASCH kürzlich (CAO ET AL. 2000) eine Herkunft der klarzelligen Nierenzellkarzinome von Zellen des Sammelrohres. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen und untermauern aber das oben dargelegte histogenetische Konzept. So weist das klarzellige Nierenzellkarzinom eine Expression von Claudin 2 und Claudin 3 auf, die beide auch im proximalen Tubulus zu finden sind. Im chromophoben Nierenzellkarzinom finden sich Claudin 3 und Claudin 4, von denen Claudin 3 in allen Nephronabschnitten inklusive der Sammelrohre und Claudin 4 spezifisch nur in den Sammelrohren vorkommt. Im papillären Nierenzellkarzinom zeigt sich eine Expression von Claudin 2, Claudin 3 und Claudin 4. Hierbei ist Claudin 2 ein spezifisches Antigen des proximalen Tubulus, während Claudin 4 ausschließlich in den Sammelrohren auftritt.

Wie die oben genannten Antigene führen also auch die Claudine beim papillären Nierenzellkarzinom zu keiner eindeutigen Zuordnung.

Mit den hier vorgestellten Ergebnissen können nun die von STÖRKE (1993) vermuteten Abstammungen der einzelnen Nierenzellkarzinome gestützt werden. Aufgrund der vorgefundenen Expressionsprofile scheint eine Abstammung der klarzelligen Nierenzellkarzinome von Zellen des proximalen Nierentubulus wahrscheinlich. Auch für das chromophobe Karzinom ist mit einiger Sicherheit eine Abstammung von den Zellen der Sammelrohre als gegeben anzunehmen. Auch hier unterstützen die Claudin-Befunde die früheren Marker-Ergebnisse von STÖRKE. Lediglich die papillären Nierenzellkarzinome sind aufgrund ihres Claudin-Besatzes nicht eindeutig einer Herkunft aus einem bestimmten Nephronabschnitt zuzuordnen. Auch unter Zuhilfenahme anderer Kriterien lässt sich keine eindeutige Aussage zur Histogenese dieses Nierenzellkarzinomtyps machen. Hierbei sollte man allerdings immer im Blick behalten, dass es bei der Tumorgenese immer wieder zu Veränderungen der Expressionsmuster kommen kann. So können im Zuge der Entdifferenzierung von Tumorzellen verschiedene Genprodukte hoch- oder herunterreguliert werden (GOULD, 1987). Auch ist die Frage nach der epithelialen Stammzelle in der adulten Niere – als möglicher Zielzelle einer malignen Transformation – noch ungeklärt (AL-AWQATI ET AL. 2002).

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Ergebnisse ist, dass hier erstmals in allen Nierenzellkarzinom-Typen, sogar im chromophoben Karzinom, auf molekularer Ebene TJ-Äquivalente nachgewiesen werden können. Die immunhistochemischen Verteilungsmuster decken dabei die Existenz polarer Strukturen, insbesondere oft rudimentärer Lumina, auf, die morphologisch zum Teil kaum in Erscheinung treten. Ob den für Claudine (und andere TJ-Proteine) immunreaktiven Strukturen in den Tumoren tatsächlich echte TJ zugrunde liegen, ist zu vermuten, müsste aber durch zukünftige elektronenmikroskopische Untersuchungen bewiesen werden. Unseres Wissens sind auf elektronenmikroskopischer Ebene TJ-Strukturen

in Nierenzellkarzinomen bislang nur vereinzelt beschrieben worden (STÖRKEL 1993).

In diesem Zusammenhang sind die Ergebnisse aus den Färbungen mit Antikörpern gegen ZO-1 und Occludin von Interesse. Diese Proteine sind ebenfalls spezifisch für TJ (zum Vorkommen in der Kaninchen-Niere siehe GONZALEZ-MARISCAL ET AL. 2000), wenngleich sie in tumorösen Geweben noch nicht beschrieben worden sind. In dieser Arbeit werden die Antikörper als Ergänzung zu den Claudin-Analysen angesehen. Es wird somit für die menschliche Niere die Aussage möglich, dass es hier offenbar keine TJ mit Occludin bzw. ZO-1, aber ohne Claudin, gibt. Andersherum kann gezeigt werden, dass nicht in jeder TJ, die Claudine enthält, auch Occludin nachweisbar ist. Dies lässt sich an den Befunden in den verschiedenen Tumorentitäten gut nachvollziehen (siehe Tabelle 3.2). Während es in den papillären und chromophoben Nierenzellkarzinomen zu einer konstanten Expression von Occludin und ZO-1 kommt, ist die gefundene Expression im klarzelligen Typ sehr gering und heterogen. Occludin kann in diesen Karzinomen bis auf eine Ausnahme nicht nachgewiesen werden. Ebenso findet sich ZO-1 auch nur in vier der untersuchten Fälle. Für dieses Phänomen gibt es zwei mögliche Erklärungen. Zum einen könnte die Analyse in diesen Tumoren an die Grenze der Sensitivität der Antikörper stoßen, falls der Gehalt dieser Proteine im klarzelligen Nierenzellkarzinom unter der Nachweisgrenze liegt. Zum anderen wäre es möglich, dass es sich in diesem Karzinomtyp um – eventuell rudimentäre – TJ handelt, die ohne Occludin aufgebaut sind. Schon SAITOU ET AL. (1998) können zeigen, dass sich zwischen embryonalen Stammzellen (Maus), die kein Occludin exprimieren, dennoch intakte TJ ausbilden.

Der neueste Ansatz zur Einteilung der Nierenzelltumoren ist auf genetischen Untersuchungen basiert. So ist bei KOVACS (1999) eine Klassifizierung zu finden, die Gruppen enthält, die durch verschiedene Chromosomenaberrationen charakterisiert sind. Entsprechend zeichnen sich alle Tumoren, die der Gruppe der klarzelligen (besser konventionellen) Nierenzellkarzinome zugeordnet werden, durch eine Deletion im

Chromosom 3p, einem Tumorsuppressorgenloкус, und eine Mutation im VHL(von Hippel Lindau)-Gen aus. Von dieser Grundveränderung ausgehend bilden sich zwei Klassen. Die eine ist durch eine zusätzliche Deletion der Chromosomen 9p, 13q und 18q charakterisiert, die andere durch eine Deletion von Chromosomen 6q und 17p sowie eine Überexpression von 17q. Für die Metastasierungstendenz dieses Tumortyps scheint eine Deletion im Chromosom 8p von Bedeutung zu sein. Bei den Tumoren aus der Gruppe der papillären Nierenzellkarzinome kommt es zu einer Trisomie 7 oder 17. Des weiteren können eine Überexpression von Chromosom 3q, 10,12 und 16 sowie eine Missensemutation im Genloкус des MET-Protoonkogen (Chromosom 7q31) auftreten. Alle Karzinome aus der Gruppe der chromophoben Tumoren sind durch einen Verlust der Chromosomen 1, 2, 6, 10, 13, 17, 21 oder Y gekennzeichnet.

Anhand dieser Befunde wird sich die Diagnostik des Nierenzellkarzinoms in Zukunft vielleicht verändern. Es wäre dann möglich, durch eine präoperative Feinnadelbiopsie Gewebe zu gewinnen, mit dem sowohl eine histologische wie auch eine genetische Diagnostik mit Hilfe von Markersets zur Mikrosatelliten-Analyse für die einzelnen Tumoren erfolgen kann (KOVACS, 1999). Bislang ist aber, nicht zuletzt aus Zeit- und vor allem Kostengründen, auf die herkömmliche Diagnostik anhand der Morphologie und Immunhistochemie nicht zu verzichten. Bei dieser Form der Diagnostik könnte Claudin 4 ergänzend zur – nicht immer eindeutigen – Hale-Färbung zur Anwendung kommen, um den chromophoben Typ des Nierenzellkarzinoms zu belegen. Eventuell ist es möglich, die einzelnen Claudine, die für die drei verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Nierenzellkarzinome typisch sind, in solche genetischen Analysen miteinzubeziehen und anhand der selektiven Expression auf RNA-Ebene Aussagen zum Tumortyp zu machen. Es wäre auch denkbar, dass ein Zusammenhang zwischen den verschiedenen Claudin-Verteilungen und der Metastasierungstendenz der Tumoren gefunden wird. Dies müssen weitere Studien zeigen.

4.3 Ausblick

Die Entdeckung und weitere Erforschung der Claudine ist auch für die Medizin von großer Tragweite. Es hat sich gezeigt, dass bestimmte Claudine ursächlich für einige Erkrankungen sind. So können beispielsweise WILCOX ET AL. (2001) eine Form der autosomal rezessiv vererbten Taubheit pathogenetisch mit dem Ausfall eines bestimmten Claudins korrelieren. Hier liegt eine Mutation im Gen für Claudin 14 vor. Daher kommt es zu Defekten der TJ im Corti-Organ, so dass der elektrochemische Gradient zwischen der Endolymph und dem umgebenden Gewebe nicht aufrechterhalten werden kann. Eventuell finden sich in diesem hochempfindlichen Organ weitere Krankheiten in Defekten der TJ begründet, zum Beispiel der Morbus Menière.

Auch in der Niere ist seit langer Zeit eine Erkrankung bekannt, deren Genese nun auf ein Claudin zurückgeführt werden kann. Bei einer familiären Hypomagnesämie mit Hyperkalzurie und Nephrokalzinosis kommt es zu einem massiven Magnesiumverlust, der durch orale Substitution allein nicht auszugleichen ist. Schon vor einigen Jahren wurde diese Erkrankung auf den Defekt eines Magnesiumkanals, gebildet durch das Protein Paracellin-1, in der Henle-Scheife zurückgeführt. SIMON ET AL. (1999) entdeckten, dass es sich bei diesem Paracellin-1 um Claudin 16 handelt, welches selektiv im dicken aufsteigenden Ast der Henle Schleife exprimiert wird. Dies können KIUCHI-SAISHIN ET AL. (2002) in ihren Untersuchungen an der Niere der Maus nochmals belegen.

Die Claudine stellen somit eine äußerst interessante Gruppe von Proteinen dar. Es ist zu vermuten, dass noch weitere Zusammenhänge zwischen den Claudinen und bestimmten Krankheitsbildern aufgedeckt werden können, und sich im Laufe der Zeit hieraus entscheidende Schritte in der Therapie ergeben können.

Des weiteren sind die Claudine vermutlich in Regulationsmechanismen von Zellwachstum und Tumorgenese eingebunden. Es ist offensichtlich, dass die Claudine über periphere zytoplasmatische Proteine an den TJ in Verbindung zum Zytoskelett und zu intrazellulären Signaltransduktionsmechanismen stehen. Ebenso spielen TJ auch eine wichtige Rolle bei der Migration von Immunzellen und können durchaus an Prozessen der Metastasierung von entarteten Zellen beteiligt sein. Von besonderer Bedeutung sind hier die sogenannten PDZ-Domänen (Domänen zur Protein-Protein-Interaktion, siehe unten) und „junction adhesion molecule“ (JAM), sowie weitere noch genauer zu erforschende Proteine, zum Beispiel Nektin und Afadin (FUKUHARA ET AL. 2002; TAKAI, ET AL. 2002).

Beim JAM handelt es sich um ein Transmembranprotein von ca. 40 kDa, das zur Immunglobulin-Superfamilie gehört (MARTIN-PADURA 1998). JAM hat nur eine Transmembrandomäne und sein extrazellulärer Anteil ist wie ein Immunglobulin gefaltet. Es sind noch weitere JAM-assozierte Proteine entdeckt worden, die ebenfalls zur Ig-Superfamilie gehören (PALMERI 2000; AURRAN-LOUS 2000). JAM allein ist nicht in der Lage, morphologisch und funktionell intakte TJ zu bilden. Es wird lediglich in bereits von Claudinen präformierte TJ seitlich integriert. Funktionelle Analysen ergeben, dass JAM eine entscheidende Rolle bei der Extravasation von Monozyten (MARTIN-PADURA 1998) sowie bei der transendothelialen Wanderung von Leukozyten (OSTERMANN ET AL. 2002) spielt. Außerdem kann gezeigt werden, dass JAM mit Hilfe von Nektin (FUKUHARA ET AL. 2002; TAKAI ET AL. 2002) in die TJ integriert wird. Da Nektin bislang nur in Bezug zu Cadherinen in Adhärenzverbindungen gebracht worden ist, deuten diese neuen Erkenntnisse verstärkt darauf hin, dass die verschiedenen Zell-Zell-Verbindungstypen in enger Weise vernetzt und reguliert sind.

Die Breite der Stränge der TJ von 10 nm (STAEHLIN 1973) entspricht dem Durchmesser der Connexone einer gap junction. Diese besteht aus 6 Connexonen mit je 4 Transmembrandomänen. Es besteht daher die Vermutung, dass Claudine ähnlich kompakt gelagert sind. Vermutlich ragen

die C-Termini der Claudine, die bis auf Claudin 12 alle mit Valinresten enden (FURUSE 1998; MORITA 1999), wie die Borsten einer Bürste ins Zytoplasma, wobei sie von den längeren C-Termini des Occludin durchmischt werden (TSUKITA UND FURUSE 2001). Diese C-Termini bilden mit ihren Valin-Resten eine Art Magnet, welcher Proteine anzieht, die an eben diese Valinreste binden. Diese Bindung geschieht über spezielle Domänen in Proteinen, die als proteinbindende Domänen (PDZ-Domänen,) bezeichnet werden und zuerst in den Proteinen PSD-95, DLG und ZO-1 beschrieben worden sind. So binden zum Beispiel die ZO-Proteine (ZO-1, ZO-2, ZO-3) über ihre PDZ-Domäne an Claudine (ITOH 1999) und mit ihrer GUK-Domäne an Occludin (FURUSE 1994; ITOH 1994; FANNING 1998). Auch JAM bindet an ZO-1 und andere PDZ-enthaltende Proteine (BAZZONI 2000; EBNET 2000; MARTINEZ-ESTRADA 2001). Über die Verbindung dieser PDZ-enthaltenden Proteine und auch durch eine direkte Verbindung der TJ-Proteine besteht ein intensiver Kontakt sowohl zu Proteinen des Zytoskeletts, wie den Actin-Mikrofilamenten, als auch zu denen von Signaltransduktionskaskaden.

Weitere periphere Proteine der TJ sind Cingulin (CITI 1988; CORDENOSI 1999), das eine Verbindung zum Aktin-Skelett herstellt, 7H6-Antigen (ZHONG 1993), Symplekin (KEON 1996), G-Proteine (SAHA 1998), die Einfluss auf der Regulation der TJ-Formation nehmen, Rab 3b und Rab 13 (WEBER 1994; ZAHRAOUI 1994) und Sec6/Sec8-Homologa (GRINDSTAFF 1998).

Aus dieser Vielzahl von Proteinen, deren genauere Bedeutung für die TJ noch weiter erforscht werden muss, ist ersichtlich, auf welch komplexe Weise die TJ mit der Zelle in Verbindung stehen. Hier sind Erklärungen für die genauen Mechanismen zu Zellproliferation und -untergang, zur Signaltransduktion und ebenfalls zur exakten Zielfindung der transmembranären Bestandteile auf ihrem Weg von der Bildung bis zur Formation der TJ zu erwarten. Aufgrund dieser Erkenntnisse ist zu vermuten, dass den in den Nierenzellkarzinomen exprimierten Claudinen eine tumorbiologische Relevanz innewohnt. Daher könnte sich eine Bedeutung dieser Proteine beim Wachstum und der Progression dieser klinisch nach wie vor sehr problematischen Tumoren aufdecken lassen.

5 Zusammenfassung

In vielzelligen Organismen sind TJ ein essentieller Bestandteil der Zellverbände von polaren Epithelien und von Endothelien. Sie dichten die Zellzwischenräume ab und dienen somit der Etablierung verschiedener Kompartimente und der Aufrechterhaltung der Polarität von Zellen.

Kürzlich konnte mit der Familie der Claudine ein wesentlicher Bestandteil der TJ identifiziert werden. Sie gehören neben Occludin zu den transmembranären Proteinen in TJ. Es konnte gezeigt werden, dass die Claudine ein gewebspezifisches Verteilungsmuster besitzen. Da die Claudine in verschiedenen Kombinationen exprimiert werden können, und dieses Expressionsmuster mit unterschiedlichen Eigenschaften in der Dichtigkeit der TJ zu korrelieren scheint, soll in dieser Arbeit untersucht werden, ob ein zelltypspezifisches Expressionsmuster der Claudine entlang des Tubulussystems vorliegt.

Mit Hilfe der Immunhistochemie an Paraffinschnitten und spezifischer Antikörper gegen Claudin 1, Claudin 2, Claudin 3, Claudin 4, Claudin 8, Claudin 11, Occludin und ZO-1 werden in dieser Arbeit erstmals für den Menschen die einzelnen – durch spezifische Marker identifizierten – Nierentubulusabschnitte charakterisiert. Es kann gezeigt werden, dass jeder Abschnitt des Nephrons – vom Glomerulum bis zum Sammelrohr – durch einen gewissen Claudin-Besatz charakterisiert ist. Dieses Expressionsmuster kann zusammen mit aktuellen zellphysiologischen Erkenntnissen in einen funktionellen Zusammenhang mit den diversen Resorptions- und Eliminationsvorgängen in den verschiedenen Tubulusabschnitten gebracht werden. So wird die Funktion des proximalen Tubulus vornehmlich durch die Expression von Claudin 2 bestimmt, welche zur Ausbildung durchlässiger („leaky“) TJ führt. Im Sammelrohr hingegen wird kein Claudin 2, dafür aber u.a. Claudin 4 exprimiert. Dies ist mit einer hohen Dichtigkeit der TJ in diesem Nephronsegment korreliert. Des weiteren kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Nierengewebe von Maus

(publizierte Daten) und Mensch (vorliegende Arbeit) bezüglich der Expression von Claudinen in den wesentlichen Punkten entsprechen.

Da bislang nur in sehr vereinzelt ultrastrukturellen Untersuchungen TJ in Nierenzellkarzinomen beschrieben sind, wurde in dieser Arbeit das Vorkommen von Claudinen in den drei häufigsten Tumorentitäten der Niere, den klarzelligen (n=11), den papillären (n=10) und den chromophoben (n=7) Nierenzellkarzinomen analysiert. Zum einen kann mit dem immunhistochemischen Nachweis von Claudinen sowie von Occludin und ZO-1 in diesen Karzinomen das Vorliegen von TJ oder ähnlichen Strukturen als sehr wahrscheinlich angenommen werden. Zum anderen zeigt die Analyse der Expressionsmuster, dass die Nierenzellkarzinome anhand ihres Claudin-Besatzes in drei Gruppen unterteilt werden können, die den oben genannten Gruppen des aktuellen Klassifikationsschemas entsprechen. So ist der klarzellige Typ durch die nahezu ausschließliche Expression von Claudin 2 charakterisiert, der papilläre Typ weist Claudin 2, Claudin 3 und Claudin 4 auf, während im chromophoben Typ ausschließlich Claudin 3 und Claudin 4 nachzuweisen sind.

Mit diesen Erkenntnissen kann die aktuelle Klassifikation der Nierenzellkarzinome auch im Hinblick auf die Expression der Claudine unterstützt werden. Des weiteren können die Claudine 2 und 4 in der immunhistologischen Diagnostik bei unklaren Fällen herangezogen werden, insbesondere solange die molekulargenetische Analyse aus Zeit- und Kostengründen noch nicht geeignet ist.

Außerdem lässt sich mit dem Claudin-Besatz der einzelnen Tumoren und einem Vergleich mit den Nephronsegmenten des Normalnierengewebes das gängige, aber nicht unumstrittene Konzept der Histogenese der Nierenzellkarzinome bestätigen. So scheint sich das klarzellige Karzinom von Zellen des proximalen Tubulus, das chromophobe Karzinom von Zellen des Sammelrohres herzuleiten. Lediglich für das papilläre Karzinom ist eine solche Aussage auch nach der Analyse der Claudine nicht möglich geworden. Dieser Typ scheint weiterhin eine Zwischenstellung einzunehmen, da sich im Tumorgewebe Claudine nachweisen lassen, die sowohl den proximalen Tubulus als auch das Sammelrohr charakterisieren.

V Literaturverzeichnis

Al-Awqati Q, Oliver JA (2002) Stem cells in the kidney. *Kidney Int* 61, 387-395.

Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, Schoeneberg T, Mankertz J, Schulzke JD, Fromm M (2002) Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci* 115, 4969-4976.

Ando-Akatsuka Y, Saitou M, Hirase T, Kishi M, Sakakibara A, Itoh M, Yonemura S, Furuse M, Tsukita S. (1996) Interspecies diversity of the occludin sequence: cDNA cloning of the human, mouse, dog and rat-kangaroo homologues. *J Cell Biol* 133, 43-47.

Aurrand-Lons MA, Duncn L, Du Pasquire L, Imhof BA (2000) Cloning of JAM-2 and JAM-3; an emerging junctional adhesion molecular family? *Curr Top Microbiol Immunol* 251, 91-98.

Balda MS, Flores-Maldonado C, Cereijido M, Matter K (2000) Multiple domains of occludin are involved in the regulation of paracellular permeability. *J Cell Biochem* 78, 85-96.

Balda MS, Whitney JA, Flores C, Gonzalez S, Cereijido M, Matter K (1996) Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein. *J Cell Biol* 134, 1031-1049.

Balda MS, González-Mariscal L, Matter K, Cereijido M, Anderson JM (1993) Assembly of the tight junction: the role of diacylglycerol. *J Cell Biol* 121, 491-502.

Bazzoni G, Martinez-Estrada OM, Orsenigo F, Cordenonsi M, Citi S, Dejana E (2000) Interaction of junctional adhesion molecule with the tight junction components ZO-1, cingulin and occludin. *J Biol Chem* 275, 20520-20526.

Brizuela BJ, Wessely O, De Robertis EM (2001) Overexpression of the *Xenopus* tight junction protein claudin causes randomization of the left-right body axis. *Dev Biol* 230, 217-229.

Cao Y, Karsten U, Bannasch P (2000) Expression of MUC1, Thomsen-Friedenreich-related antigens, and cytokeratin 19 in human renal cell carcinomas and tubular clear cell lesions. *Virchows Arch* 436, 119-126.

Cereijido M, González-Mariscal L, Contreras G (1989) Tight junctions: barrier between higher organisms and environment. *News in Physiol* 4, 72.

Citi S, Sabanay H, Jakes R, Geiger B, Kendrick-Jones (1988) Cingulin, a new peripheral component of tight junctions. *Nature* 333, 272-276.

Chen Y, Lu Q, Schneeberger EE, Goodenough DA (2000) Restoration of tight junction structure and barrier function by down-regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in ras-transformed Madin-Darby canine kidney cells. *Mol Biol Cell* 11, 849-862.

Claude P (1978) Morphological factors influencing transepithelial permeability: a model for the resistance of the zonula occludens. *J Membr Biol* 10, 219-232.

Claude P, Goodenough DA (1973) Fracture faces of zonulae occludentes from "tight" and "leaky" epithelia. *J Cell Biol* 58, 390-400.

Cordenonsi M, D'Atri F, Hammar E, Parry DA, Kendrick-Jones J, Shore D, Citi S (1999) Cingulin contains globular and coiled-coil domains and interacts with ZO-1, ZO-2, ZO-3 and myosin. *J Cell Biol* 147, 1569-1582.

Dragsten PR, Blumenthal R, Handler JS (1981) Membrane asymmetry in epithelia: is tight junction a barrier to diffusion in the plasma membrane? *Nature* 294, 718-722.

Enck AH, Berger UV, Yu AS (2001) Claudin-2 is selectively expressed in proximal nephron in mouse kidney. *Am J Physiol* 281, F966-974.

Fanning AS, Mitic LL, Anderson JM (1999) Transmembrane proteins in the tight junction barrier. *J Am Soc Nephrol* 10, 1337-1345.

Fanning AS, Jameson B, Jesaitis LA, Anderson JM (1998) The tight junction protein ZO-1 establishes a link between the transmembrane protein occludin and the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 273, 29745-29753.

Farquhar MG, Palade GE (1963) Junctional complexes in various epithelia. *J Cell Biol* 17, 375-412.

Fujita K, Katahira J, Horiguchi Y, Sonoda N, Furuse M, Tsukita S (2000) Clostridium perfringens enterotoxin binds to the second extracellular loop of claudin-3, a tight junction integral membrane protein. *FEBS Lett* 476, 258-261.

Fukuhara A, Irie K, Nakanishi H, Takekuni K, Kawakatsu T, Ikeda W, Yamada A, Katata T, Honda T, Sato T, Shimizu K, Ozaki H, Horiuchi H, Kita T, Takai Y (2002) Involvement of nectin in the localization of junctional adhesion molecule at tight junctions. *Oncogene* 21, 7642-76455.

Furuse M, Hata M, Furuse K, Yoshida Y, Haratake A, Sugitani Y, Noda T, Kubo A, Tsukita S (2002) Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. *J Cell Biol* 18, 1099-1111.

Furuse M, Furuse K, Sakaki H, Tsukita S (2001) Conversion of zonulae occludentes from tight to leaky strand type by introducing claudin-2 into Madin-Darby canine kidney I cells. *J Cell Biol* 153, 263-272.

Furuse M, Sakaki H, Tsukita S (1999) Manner of interaction of heterogenous claudin species within and between tight junction strands. *J Cell Biol* 147, 891-903.

Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S (1998) A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol* 143, 391-401.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S (1998) Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141, 1539-1550.

Furuse M, Itoh M, Hirase T, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1994) Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions. *J Cell Biol* 127, 1617-1626.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S, Tsukita S (1993) Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123, 1777-1788.

Gallardo JM, Hernandez JM, Contreras RG, Flores-Maldonado C, González-Mariscal L, Cereijido M (2002) Tight junctions are sensitive to peptides eliminated in the urine. *J Membr Biol* 188, 33-42.

González-Mariscal L, Namorado MC, Martin D, Luna J, Alarcon L, Islas S, Valencia L, Muriel P, Ponce L, Reyes JL (2000) Tight junction proteins ZO-1, ZO-2 and occludin along isolated renal tubules. *Kidney Int* 57, 2386-2402.

Gow A, Southwood CM, Li JS, Pariali M, Riordan GP, Brodie SE, Danias J, Bronstein JM, Kachar B, Lazzarini RA (1999) CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in OSP/claudin-11 null mice. *Cell* 99, 649-659.

Grindstaff KK, Yeaman C, Anandasabapathy N, Hsu SC, Rodriguez-Boulan E, Scheller RH, Nelson WJ (1998) Sec6/8 complex is recruited to cell-cell contacts and specifies transport vesicle delivery to the basal-lateral membrane in epithelial cells. *Cell* 93, 731-740.

Gumbiner B (1993) Breaking through the junction barrier. *J Cell Biol* 123, 1631-1633.

Gumbiner B, Lowenkopf T, Apatira D (1991) Identification of a 160-kDa polypeptide that binds to the tight junction protein ZO-1. *Proc Nat Acad Sci USA* 88, 3460-3464.

Hahskins J, Gu L, Wittchen ES, Hibbard J, Stevenson BR (1998) ZO-3, a novel member of the MAGUK protein family found at the tight junction, interacts with ZO-1 and occludin. *J Cell Biol* 141, 199-208.

Hamazaki Y, Itoh M, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (2002) Multi-PDZ domain protein 1 (MUPP1) is concentrated at tight junctions through its possible interaction with claudin-1 and junctional adhesion molecule. *J Biol Chem* 277, 455-461.

Harhaj N, Barber AJ, Antonetti DA (2002) Platelet-Derived growth factor mediates tight junction redistribution and increases permeability in MDCK cells. *J Cell Physiol* 193, 349-364.

Heiskala M, Peterson PA, Garrod DR (2001) The roles of claudin superfamily proteins in paracellular transport. *Traffic* 2, 93-98.

Hierholzer K, Fromm M (2000) Funktionen der Nieren. In: *Physiologie des Menschen*, edited by Schmidt RF, Thews G. Springer, Heidelberg, 28. Auflage, pp 737-777.

Hirano T, Kobayashi N, Takasuga A, Nakamaru T, Hirotsune S, Sugimoto Y (2000) Null mutations of PCLN-1/Claudin-16 results in bovine chronic interstitial nephritis. *Genome Res* 10, 659-663.

Holm S (1979) A simple sequentially rejective multiple test procedure. *Scand J Statist* 6, 65-70.

Inai T, Kobayashi J, Shiata Y (1999) Claudin-1 contributes to the epithelial barrier function in MDCK cells. *Eur J Cell Biol* 78, 849-855.

Itoh M, Morita K, Tsukita S (1999) Characterization of ZO-2 as a MAGUK family member associated with tight and adherens junctions with a binding affinity to occludin and α -catenin. *J Biol Chem* 274, 5981-5986.

Itoh M, Furuse M, Morita K, Kubota K, Saitou M, Tsukita S (1999) Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2 and ZO-3, with the COOH termini of claudins. *J Cell Biol* 147, 1351-1363.

Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Kitani-Yasuda T, Tsukita S, Tsukita S (1993) The 220-kDa protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 121, 491-502.

Jesaitis LA, Goodenough DA (1994) Molecular characterization and tissue distribution of ZO-2, a tight junction protein homologous to ZO-1 and the *Drosophila* discs-large tumor suppressor protein. *J Cell Biol* 124, 949-961.

Junqueira LC, Carneiro J, Kelly (2002) Harnorgane. In: *Histologie*, edited by Junqueira LC, Carneiro J. Springer, Heidelberg, 5. Auflage, pp 549-576.

Kachar B, Reese TS (1982) Evidence for the lipid nature of tight junction strands. *Nature* 296, 464-466.

Keon BH, Schäfer S, Kuhn C, Grund C, Franke WW (1996) Symplekin, a novel type of tight junction plaque protein. *J Cell Biol* 134, 1003-1018.

Kingugasa T, Sakaguchi T, Gu X, Reinecker HC (2000) Claudins regulate the intestinal barrier response to immune mediators. *Gastroenterology* 10, 659-663.

Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tsukita S (2002) Differential expression pattern of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol* 13, 875-886.

Kobayashi J, Inai T, Shibata Y (2002) Formation of tight junction strands by expression of claudin-1 mutants in their ZO-1 binding site in MDCK cells. *Histochem Cell Biol* 117, 29-39.

Kojima T, Kokai Y, Chiba H, Osnai M, Kuwahara K, Mori M, Mochizuki Y, Sawada N (2001) Occludin and claudin-1 concentrate in the midbody of immortalized mouse hepatocytes during cell division. *J Histochem Cytochem* 49, 333-340.

Kovacs G (1999) Molekulare Genetik und Diagnose der Nierenzelltumoren. *Urologe A* 38, 433-441.

Kovacs G, Akhtar M, Beckwith BJ, Bugert P, Cooper CS, Delahunt B, Eble JN, Fleming S, Ljungberg B, Medeiros LJ, Moch H, Reuter VE, Ritz E, Roos G, Schmidt D, Srigley JR, Storkel S, van den Berg E, Zbar B (1997) The Heidelberg classification of renal cell tumors. *J Pathol* 183, 131-133.

Kubota K, Furuse M, Sasaki H, Sonoda N, Fujita K, Nagafuchi A, Tsukita S (1999) Ca^{2+} -independent cell adhesion activity of claudins, integral membrane proteins of tight junctions. *Curr Biol* 9, 1035-1038.

Kucharzik T, Walsh SV, Chen J, Parkos CA, Nusrat A (2001) Neutrophil transmigration in inflammatory bowel disease is associated with differential expression of epithelial intercellular junction proteins. *Am J Pathol* 159, 2001-2009.

Kui WY, Lee WM, Cheng CY (2001) Transforming growth factor-beta3 perturbs the inter-Sertoli tight junction permeability barrier in vitro possibly mediated via effects on occludin, zonula occludens-1 and claudin-1. *Endocrinology* 142, 1865-1877.

Liebner S, Fischmann A, Rascher G, Duffner F, Grote EH, Kalbacher H, Wolburg H (2000) Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol* 100, 323-331.

Liebner S, Kniesel U, Kalbacher H, Wolburg H (2000) Correlation of tight junction morphology with the expression of tight junction proteins in blood-brain barrier endothelial cells. *Eur J Cell Biol* 79, 707-717.

Madara JL (1998) Regulation of the movement of solutes across tight junctions. *Annu Rev Physiol* 60, 143-159.

Madara JL (1988) Tight junction dynamics: Is paracellular transport regulated? *Cell* 53, 497-498.

Martinez-Estrada OM, Villa A, Breviario F, Orsenigo F, Dejana E, Bazzoni G (2001) Association of junctional adhesion molecule with calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase (CASK/LIN-2) in human epithelial Caco-2 cells. *J Biol Chem* 276, 9291-9296.

Martin-Padura I, Lostaglio S, Schneemann M, Williams L, Romano M, Fruscella P, Panzeri C, Stoppacciaro A, Ruco L, Villa A, Simmons D, Dejana E (1998) Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142, 117-127.

McCarthy KM, Francis SA, McCormack JM, Lai J, Rogers RA, Skare IB, Lynch RD, Schneeberger EE (2000) Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells. *J Cell Sci* 113, 3387-3398.

McClane BA (2000) Clostridium perfringens enterotoxin and intestinal tight junctions. *Trends Microbiol* 8, 145-146

Michl P, Buchholz M, Rolke M, Kunsch S, Lohr M, McClane B, Tsukita S, Leder G, Adler G, Gress TM (2001) Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using Clostridium perfringens enterotoxin. *Gastroenterology* 121, 678-684.

Miyamori H, Takino T, Kobayashi Y, Tokai H, Itoh Y, Seiki M, Sato H (2001) Claudin promotes activation of pro-matrix metalloproteinase-2 mediated by membrane-type matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 276, 28204-28211.

Moll R, Hage C, Thoenes W (1991) Expression of intermediate filament proteins in fetal und adult human kidney: modulations of intermediate filament patterns during development and in damaged tissue. *Lab Invest* 65, 74-86.

Morcos Y, Hosie MJ, Bauer HC, Chan-Ling T (2001) Immunolocalization of occludin and claudin-1 to tight junctions in intact CNS vessels of mammalian retina. *J Neurocytol* 30, 107-123.

Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S (1999a) Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. *J Cell Biol* 147, 185-194.

Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S (1999b) Claudin-11/OSP-based tight junction of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. *J Cell Biol* 145, 579-588.

Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S (1999c) Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 511-516.

Moroi S, Saitou M, Fujimoto K, Sakakibara A, Furuse M, Yoshida O, Tsukita S (1998) Occludin is concentrated at tight junctions of mouse/rat but not human/guinea pig Sertoli cells in testes. *Am J Physiol* 274, C1708-1717.

Muresan Z, Paul DL, Goodenough DA (2000) Occludin1B, a variant of the tight junction protein. *Mol Biol Cell* 11, 627-634.

Niimi T, Nagashima K, Ward JM, Minoo P, Zimonjic DB, Popescu NC, Kimura S (2001) Claudin-18, a novel downstream target gene for the T/EBP/NKX2.1 homeodomain transcription factor, encodes lung- and stomach-specific isoforms through alternative splicing. *Mol Cell Biol* 21, 7380-7390.

Nishimura M, Kakizaki M, Ono Y, Morimoto K, Takeuchi M, Inoue Y, Imai T, Takai Y (2002) JEAP, a novel component of tight junctions in exocrine cells. *J Biol Chem* 277, 5583-5587.

Ostermann G, Weber KS, Zerneck A, Schroder A, Weber C (2002) JAM-1 is a ligand of the beta(2) integrin LFA-1 involved in transendothelial migration of leukocytes. *Nat Immunol* 3, 151-158.

Palmeri D, van Zante A, Huang CC, Hemmerich S, Rosen SD (2000) Vascular endothelial junction-associated molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily, is localized to intercellular boundaries of endothelial cells. *J Biol Chem* 275, 19139-19145.

Pisam M, Ripoche P (1976) Redistribution of surface macromolecules in dissociated epithelial cells. *J Cell Biol* 71, 909-920.

Powell DW (1981) Barrier function of epithelia. *Am J Physiol* 241, G275-288.

Reuss L (1992) in *Tight Junctions* edited by Cereijido M, CRC, London, pp 49-66 .

Reyres JL, Lamas M, Martin D del Carmen Namorado M, Islas S, Luna J, Tauc M, González-Mariscal L (2002) The renal segmental distribution of claudins changes with development. *Kidney Int* 62, 476-487.

Saha C, Nigam SK, Denker BM (1998) Involvement of $G_{\alpha_{12}}$ in the maintenance and biogenesis of epithelial cell tight junctions. *J Biol Chem* 273, 21629-21633.

Saitou M, Furuse M, Sasaki H, Schulzke JD, Fromm M, Takano H, Noda T, Tsukita S (2000) Complex phenotype of mice lacking occludin, a component of tight junction strands. *Mol Biol Cell* 11, 4131-4142.

Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, Itoh M, Fujimoto T, Furuse M, Takano H, Noda T, Tsukita S (1998) Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. *J Cell Biol* 141, 397-408.

Saitou M, Ando-Akatsuka Y, Itoh M, Furuse M, Inazawa J, Fujimoto K, Tsukita S (1997) Mammalian occludin in epithelial cells: its expression and subcellular distribution. *Eur J Cell Biol* 73, 222-231.

Schneeberger EE, Lynch RD (1992) Structure, function and regulation of the cellular tight junctions. *Am J Physiol* 262, L647-661.

Simon DB, Lu Y, Choate KA, Velazquez H, Al-Sabban E, Praga M, Casari G, Bettinelli A, Colussi G, Rodriguez-Soriano J, McCredie D, Milford D, Sanjad S, Lifton RP (1999) Paracellin-1, a renal tight junction protein required for paracellular Mg^{2+} resorption. *Science* 285, 103-106.

Sökelland J, Schulze H, Rübben H (2001) Gut- und bösartige Neubildungen. In: *Urologie*, edited by Sökelland J, Schulze H, Rübben H. Thieme, Stuttgart, 12. Auflage, pp 257-264.

Sonoda N, Furuse M, Sasaki H, Yonemura S, Katahira J, Horiguchi Y, Tsukita S (1999) Clostridium perfringens enterotoxin fragment removes specific claudins from tight junction strands: Evidence for direct involvement of claudins in tight junction barrier. *J Cell Biol* 147, 195-204.

Spring K (1998) Routes and mechanism of fluid transport by epithelia. *Annu Rev Physiol* 60, 105-119.

Staehlin LA (1973) Further observations on the fine structure of freeze-cleaved tight junctions. *J Cell Sci* 13, 763-786.

Stevenson BR (1999) Understanding the tight junction clinical physiology at the molecular level. *J Clin Invest* 285, 103-106.

Stevenson BR, Anderson JM, Goodenough DA, Mooseker MS (1988) Tight junction structure and ZO-1 content are identical in two strains of Madin-Darby canine kidney cells which differ in transepithelial resistance. *J Cell Biol* 107, 2404-2408.

Stevenson BR, Siliciano JD, Mooseker MS, Goodenough DA (1986) Identification of ZO-1: a high molecular weight polypeptide associated with the tight junction (zonula occludens) in a variety of epithelia. *J Cell Biol* 103, 755-766.

Störkel S (2002) Tumors of the Kidney and Urinary Tract. *Verh Dtsch Ges Path* 86, 28-39.

Störkel S (1999) Epitheliale Tumoren der Niere. *Urologe A* 38, 425-432.

Störkel S, Eble JN, Adlakha K, Amin M, Blute ML, Bostwick DG, Darson M, Delahunt B, Iczkowski K (1997) Classification of renal cell carcinoma, workgroup 1. *Cancer* 80, 987-989.

Störkel S, van den Berg (1995) Morphologische Klassifikation und Zytogenetik humaner epithelialer Nierenzelltumoren. *Verh Dtsch Ges Pathol* 79, 643-650.

Störkel S (1993) *Karzinome und Onkozytome der Niere*. Fischer, Stuttgart, Jena, New York.

Takai Y, Nakanishi H (2002) Nectin and afadin: novel organizers of intercellular junctions. *J Cell Sci* 116, 17-27

Takaki Y, Hirai S, Manabe N, Izumi Y, Hirose T, Nakaya M, Suzuki A, Mizuno K, Akimoto K, Tsukita S, Shuin T, Ohno S (2001) Dynamic changes in protein components of the tight junction during liver regeneration. *Cell Tissue Res* 305, 399-409.

Tebbe B, Mankertz J, Schwarz C, Amasheh S, Fromm M, Assaf C, Schultz-Ehrenburg U (2002) Tight junction proteins: a novel class of integral membrane proteins. Expression in human epidermis and in HaCaT keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 294, 14-18

Thoenes W, Störkel S, Rumpelt HJ (1986) Histopathology and classification of renal cell tumors (adenomas, oncocytomas and carcinomas). The basic cytological and histomorphological elements and their use for diagnostics. *Pathol Res Pract* 181, 125-143.

Tsukita S, Furuse M (2002) Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol* 14, 531-536.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M (2001) Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 285-293.

Tsukita S, Furuse M (2000) Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol* 149, 13-16.

Tsukita S, Furuse M (2000) The structure and function of claudins, cell adhesion molecules at tight junctions. *Ann N Y Acad Sci* 915, 129-135.

Tsukita S, Furuse M (1999) Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol* 9, 268-273.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M (1999) Structural and signaling molecules come together at tight junctions. *Curr Opin Cell Biol* 11, 628-633.

Turksen K, Troy TC (2001) Claudin-6: a novel tight junction molecule is developmentally regulated in mouse embryonic epithelium. *Dev Dyn* 222, 292-300.

Van Itallie C, Rahner C, Anderson JM (2001) Regulated expression of claudin-4 decreases paracellular conductance through a selective decrease in sodium permeability. *J Clin Invest* 107, 1319-1327.

Van Meer G, Simon K (1986) The function of tight junctions in maintaining differences in lipid composition between the apical and basolateral cell surface domains of MDCK cells. *EMBO J* 5, 1455-1464.

Weber E, Berta G, Tousson A, St John P, Green MW, Gopalokrishnan U, Jilling T, Sorscher EJ, Elton TS, Abrahamson DR (1994) Expression and polarized targeting of a rab3 isoform in epithelial cells. *J Cell Biol* 125, 583-594.

Weber S, Schlingmann KP, Nejsum LN, Nielsen S, Engel H, Grzeschik KH, Seyberth HW, Grone HJ, Nusing R, Konrad M (2001) Primary gene structure and expression studies of rodent paracellin-1. *J Am Soc Nephrol* 12, 2664-2672.

Weber S, Schneider L, Peters M, Misselwitz J, Ronnefarth G, Boswald M, Bonzel KE, Seeman T, Sulakova T, Kuwertz-Broking E, Gregoric A, Palcoux JB, Tasic V, Manz F, Scharer K, Seyberth HW, Konrad M (2001) Novel paracellin-1 mutations in 25 families with familial hypomagnesemia with hypercalciuria and nephrocalcinosis. *J Am Soc Nephrol* 12, 1872-1881.

Wilcox ER, Burton QL, Naz S, Riazuddin S, Smith TN, Ploplis B (2001) Mutations in the gene encoding tight junction claudin-14 cause autosomal recessive deafness DFNB29. *Cell* 104, 165-172.

Willott E, Balda MS, Fanning AS, Jameson B, Van Itallie C, Anderson JM (1993) The tight junction protein ZO-1 is homologous to the Drosophila discs-large tumor suppressor protein of septate junctions. *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 7834-7838.

Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B (2001) Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci Lett* 307, 77-80.

Wong V, Gumbiner BM (1997) A synthetic peptide corresponding to the extracellular domain of occludin perturbs the tight junction permeability barrier. *J Cell Biol* 136, 399-409.

Zahraoui A, Joberty G, Arpin M, Fontaine JJ, Hellio R, Tavitian A, Louvard D (1994) A small rab GTPase is distributed in cytoplasmic vesicles in non polarized cells but colocalizes with tight junction marker ZO-1 in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* 124, 101-115.

Zambrano NR, Lubensky IA, Merino MJ, Linehan WM, Walther MM (1999) Histopathology and molecular genetics of renal cell tumors: toward unification of a classification system. J Urol 162, 1246-1258.

Zhong Y, Saitoh T, Minase T, Sawada N, Enomoto K, Mori M (1993) Monoclonal antibody 7H6 reacts with a novel tight junction-associated protein distinct from ZO-1, cingulin and ZO-2. J Cell Biol 120, 477-483.

Ziomek CA, Shulman S, Edidin M (1980) Redistribution of membrane proteins in isolated mouse intestinal epithelial cell. J Cell Biol 86, 849-857.

Zöfel P (1984) Der exakte Test nach Fisher und Yates. In: Statistik in der Praxis, edited by Zöfel P. Fischer Verlag, Stuttgart, 1. Auflage, 197-200.

VI Anhang

Tab. I: Gesamtübersicht der Reaktionen am normalen Nierengewebe

Nr.	Alter	Geschlecht	Bowmansches Kapselepithel										proximaler Tubulus										Henle Schleife										Distaler Tubulus										Sammelrohr									
			Occludin	ZO-1	Rb Cl 1 (ZY)	Rb Cl 1 (ZY)*	Rb Cl 2 (ZY)	Rb Cl 2 (TS)	Rb Cl 3 (ZY)	Rb Cl 3 (TS)	M Cl 4 (ZY)	Rb Cl 4 (TS)	Rb Cl 8	Rb Cl 11	Occludin	ZO-1	Rb Cl 1 (ZY)	Rb Cl 1 (ZY)*	Rb Cl 2 (ZY)	Rb Cl 2 (TS)	Rb Cl 3 (ZY)	Rb Cl 3 (TS)	M Cl 4 (ZY)	Rb Cl 4 (TS)	Rb Cl 8	Rb Cl 11	Occludin	ZO-1	Rb Cl 1 (ZY)	Rb Cl 1 (ZY)*	Rb Cl 2 (ZY)	Rb Cl 2 (TS)	Rb Cl 3 (ZY)	Rb Cl 3 (TS)	M Cl 4 (ZY)	Rb Cl 4 (TS)	Rb Cl 8	Rb Cl 11	Occludin	ZO-1	Rb Cl 1 (ZY)	Rb Cl 1 (ZY)*	Rb Cl 2 (ZY)	Rb Cl 2 (TS)	Rb Cl 3 (ZY)	Rb Cl 3 (TS)	M Cl 4 (ZY)	Rb Cl 4 (TS)	Rb Cl 8	Rb Cl 11		
1	44	männlich	1	3	3	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	3	2	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	3	3	1	3	1	1	3	3	3	3	3	1		
2	62	männlich	1	3	3	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	3	2	1	3	1	1	3	3	3	3	3	1		
3	69	männlich	1	3	3	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	3	3	1	3	1	1	3	3	3	3	3	1	
4	64	männlich	1	3	3	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	2	3	2	1	3	1	1	3	3	3	3	3	1		
5	79	männlich	1	3	3	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	3	2	2	1	2	1	1	3	3	3	3	3	1		
6	59	männlich	2	3	3	2	2	2	3	2	1	2	1	1	2	2	1	1	3	3	2	1	1	1	1	1	3	2	2	1	1	1	2	2	1	2	1	2	3	3	1	3	1	1	3	3	3	3	3	1		
7	58	weiblich	1	3	3	2	3	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	3	3	1	1	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	1	1	3	3	3	1	2	1	1	3	3	3	3	3	1			
8	69	männlich	1	3	3	3	2	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	3	3	3	2	1	1	3	3	3	3	3	1			
9	81	weiblich	2	3	3	3	2	2	3	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	1	1	3	3	3	1	2	1	1	3	3	3	3	3	2			
10	57	weiblich	2	3	2	3	2	1	3	2	1	1	1	1	2	2	1	1	3	2	2	1	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	1	2	1	3	3	3	1	3	1	1	3	3	3	3	2	3		
11	68	männlich	2	3	3	3	2	1	3	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	3	1	1	3	3	3	1	3	1	1	3	3	3	2	2	2		
12	69	männlich	2	3	3	3	2	2	3	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	3	3	3	1	2	1	1	3	3	3	2	3	2		
13	56	männlich	1	3	3	2	3	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	3	2	2	1	1	2	2	2	2	2	1	3	3	3	1	3	1	1	3	3	3	3	3	1		
14	64	männlich	2	3	3	3	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	3	3	3	1	2	1	1	3	3	3	3	3	1		
15	74	weiblich	1	3	3	3	1	2	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	3	2	2	3	1	1	2	2	2	1	1	2	3	3	1	2	1	1	3	3	3	3	3	2	1	
16	48	männlich	1	3	3	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	3	2	1	2	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	2	2	1	3	3	3	1	2	1	1	3	3	3	3	3	1		
17	73	männlich	1	3	3	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	3	2	2	3	1	1	2	2	2	2	1	3	3	3	1	2	1	1	3	3	3	3	3	1		
18	81	weiblich	1	3	3	2	1	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	3	3	2	1	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	2	1	2	3	3	1	2	1	1	3	3	3	2	3	1			
19	56	weiblich	1	3	3	3	2	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	3	3	1	2	1	1	2	2	2	2	1	3	3	3	1	2	1	1	3	3	3	3	3	1		
20	81	weiblich	2	3	3	3	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	3	2	2	2	1	1	1	1	3	3	1	2	1	1	2	3	2	2	1	2	3	3	1	3	1	1	3	3	3	3	2	1		
21	72	männlich	2	3	2	3	2	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	3	2	2	1	1	1	1	3	2	2	2	1	1	2	2	1	1	1	3	3	1	2	1	1	3	3	3	2	3	1			
22	74	männlich	1	3	3	3	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	3	3	2	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	3	3	1	3	1	1	3	3	3	2	2	1		
23	44	weiblich	1	3	3	2	2	1	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	3	2	1	3	1	1	3	2	2	2	1	3	3	1	2	1	1	3	3	3	3	3	1			
24	70	männlich	1	3	3	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	1	1	3	3	2	1	1	1	1	1	3	2	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	3	3	1	3	1	1	3	3	3	3	3	1		
25	73	weiblich	1	3	3	3	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	3	3	2	1	1	1	1	1	3	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	3	2	1	3	1	1	3	3	3	3	3	1		

1: keine Reaktion
2: weniger als 50% positive Färbeergebnisse
3: mehr als 50% positive Färbeergebnisse
TS: Antikörper von Prof. Dr. Tsukita
ZY: Antikörper von Zymed

Tab. II: Gesamtübersicht der Reaktionen am Tumorgewebe

Nr.	Alter	Geschlecht	Diagnose	Grad	Tumor											
					Occludin	ZO-1	Rb Cl 1 (ZY)	Rb Cl 1 (ZY)*	Rb Cl 2 (ZY)	Rb Cl 2 (TS)	Rb Cl 3 (ZY)	Rb Cl 3 (TS)	M Cl 4 (ZY)	Rb Cl 4 (TS)	Rb Cl 8	Rb Cl 11
1	69	männlich	chromophob	G1	3	2	1	1	1	1	2	1	3	2	1	1
2	58	weiblich	chromophob	G1	3	2	1	1	1	1	2	1	3	2	1	1
3	56	weiblich	chromophob	G2	2	3	1	1	1	1	2	1	3	2	1	1
4	73	männlich	chromophob	G2	2	2	1	1	1	1	2	1	3	2	1	1
5	48	männlich	chromophob	G2	2	2	1	2	1	1	2	1	3	2	1	1
6	56	männlich	chromophob	G2	2	2	1	1	1	1	2	2	3	3	2	1
7	44	weiblich	chromophob	G3	2	2	1	1	1	1	2	1	3	3	1	1
8	59	männlich	klarzellig	G1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1	1
9	72	männlich	klarzellig	G2	1	1	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1
10	81	weiblich	klarzellig	G2	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1
11	74	weiblich	klarzellig	G2	1	1	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1
12	64	männlich	klarzellig	G2	1	2	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1
13	69	männlich	klarzellig	G2	1	1	1	1	3	1	2	1	1	1	1	1
14	68	männlich	klarzellig	G2	1	1	1	2	2	1	2	1	1	1	1	1
15	57	weiblich	klarzellig	G2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
16	81	weiblich	klarzellig	G2	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1
17	66	männlich	klarzellig	G2-3	2	2	*	2	2	*	3	3	1	1	1	1
18	70	männlich	klarzellig	G3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
19	55	männlich	papillär	G1	3	3	1	3	2	2	3	3	3	2	1	1
20	79	männlich	papillär	G1	2	3	3	3	1	1	3	2	3	1	1	1
21	64	männlich	papillär	G1	2	2	1	2	1	1	3	1	3	1	1	1
22	69	männlich	papillär	G1	3	2	1	3	2	2	3	2	3	1	1	1
23	62	männlich	papillär	G1	2	2	2	2	1	1	3	1	2	1	1	1
24	44	männlich	papillär	G1	3	3	1	3	1	1	3	2	3	1	1	1
25	74	männlich	papillär	G2	2	2	1	2	1	1	3	1	3	1	1	1
26	55	männlich	papillär	G2	2	2	2	3	1	1	3	1	2	1	1	1
27	81	weiblich	papillär	G2	3	3	3	3	2	2	3	1	3	1	1	1
28	73	weiblich	papillär	G2	3	1	1	3	3	3	3	1	3	2	1	1

1: keine Reaktion

2: weniger als 50% positive Färbergebnisse

3: mehr als 50% positive Färbergebnisse

TS: Antikörper von Prof. Dr. Tsukita

ZY: Antikörper von Zymed

*: Färbung nicht durchgeführt

Lebenslauf

- | | |
|-----------|---|
| 1979 | geboren am 02. März in Hamm als Tochter vom Hans Otto Kemmer und seiner Ehefrau Reinhild Kemmer, geb. Schulze-Allen |
| 1985-1989 | Grundschule Bönen |
| 1989-1998 | Geschwister Scholl Gymnasium Unna |
| 1998 | Allgemeine Hochschulreife |
| 1998 | Beginn des Studium der Medizin an der Medizinischen Hochschule Hannover (Vorklinik) |
| 1999 | Aufnahme in die Studienstiftung des deutschen Volkes |
| 2000 | Ärztliche Vorprüfung |
| 2000 | Wechsel an die Philipps Universität Marburg |
| 2001 | Famulatur am Institut für Pathologie der Universität Marburg |
| 2001 | Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 2002 | Famulatur in der Abteilung für Anästhesie im Klinikum Spandau |
| 2002 | Famulatur in der Kinderklinik des Krankenhauses Fulda |
| 2003 | Famulatur in der Praxis für Anästhesie von Dr. Mendoza |
| 2003 | Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |
| 2004 | Wechsel an die Albert Ludwigs Universität Freiburg (Praktisches Jahr) |
| 2004-2005 | Praktisches Jahr am Hegau-Klinikum Singen und am Kantonsspital Luzern |
| 2005 | Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung |

Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

An der **Medizinischen Hochschule Hannover**:

Bargsten, Brenner, Collatz, Dörries, Fischer, Gebert, Grothe, Grube, Hausdörfer, Jürgens, Lohffs, Nave, Niemann, Nitsch, Pabst, Phillippens, Tewes, Tiemann, Ungewickell, Wendlandt, Westermann, Zühlke

An der **Philipps-Universität Marburg**:

Arnold, Barth, Baum, Becker, Bien, Christiansen, Czubayko, Gotzen, Griss, Gudermann, Happle, Hellinger, Hesse, Hofmann, Jungclas, Klenk, Klose, Koolmann, Kretschmer, Krieg, Kroll, Maisch, Mennel, Moll, Moosdorfer, Mueller, Mutters, Neubauer, Oertel, Remschmidt, Renz, Schäfer, Schmidt, Schnabel, Seyberth, Werner, Wulf

Am **Hegau-Klinikum Singen**:

Biermaier, Haack, Haller, Krieger, Pfitzenmaier, Probst, Rühland, Schillinger, Schmitz

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Roland Moll für die Überlassung des wissenschaftlichen Themas, für die ständige freundliche Supervision und Ermutigung bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Ein herzlicher Dank gilt auch Herrn Dr. A. Schmidt für die wissenschaftliche Unterstützung dieser Arbeit, jederzeit gewährte Gesprächsmöglichkeiten und die konstruktive Kritik bei deren Fertigstellung.

Weiterhin bedanke ich mich bei Prof Dr. S. Tsukita, Universität Kyoto, Japan für die freundliche Bereitstellung der Antikörper gegen verschiedene Claudine.

Herrn Prof. Dr. H. Schäfer, Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Philipps-Universität Marburg, danke ich sehr für die intensive Beratung bei den statistischen Analysen.

Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Anke Röper, Sabine Koch und Viktoria Morokina, die mir im Labor mit Rat und Tat zur Seite standen.

Weiterhin gilt mein Dank Marco Hennrich für seine grenzenlose Geduld, seinen Verzicht und seine emotionale Unterstützung.

Zu guter Letzt danke ich meinen Eltern, meiner Familie und allen Freunden, die mir mit Liebe und konstruktiver Kritik die Fertigstellung ermöglicht haben.

Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die im Fachbereich Humanmedizin in Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel

“Differentielle Expression von Claudinen entlang des menschlichen Nephrons und in epithelialen Nierenzelltumoren“

im Zentrum für Pathologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Roland Moll ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation genannten Hilfsmittel genutzt habe.

Ich habe bisher an keinem in- oder ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Ein Großteil der Daten der vorliegenden Arbeit wurde als Poster auf der 86. Tagung der deutschen Gesellschaft für Pathologie vom 3.-6. April 2002 in Wien veröffentlicht:

Kemmer I, Schmidt A, Furuse M, Tsukita S, Moll R: „Differentielle Expression von Tight-Junction-Proteinen in verschiedenen Typen des Nierenzellkarzinoms und entlang des normalen Nierentubulus.“

Kemmer I, Schmidt A, Furuse M, Tsukita S, Moll R: “Differential expression of tight-junction-proteins in different type of renal cell carcinoma and along normal kidney tubules.” Pathol. Res. Pract., Band 198, S 153-154, 2002

Eine Publikation dieser Arbeit ist in Vorbereitung und wird in Kürze eingereicht unter dem Titel: ***„Differential expression patterns of members of the family of tight-junction-associated claudins in normal human kidney and in different forms of renal cell carcinomas.“ Kemmer I, Schmidt A, Furuse M, Tsukita S, Störkel S, Moll R***

Marburg, den 01.07.2005